



**Charakterisierung des Slr1649
aus *Synechocystis* sp. PCC 6803,
ein Homolog zu Orf222 aus *Guillardia theta***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Oliver Kawach

aus Mainz

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
Marburg als Dissertation angenommen am:

22.11.2006

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe-G. Maier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Prof. Dr. Andreas Brune

Prof. Dr. Erhard Mörschel

Tag der mündlichen Prüfung:

22.12.2006

Für Nina und meine Familie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Paper:

Kawach O, Voss C, Wolff J, Hadfi K, Maier U-G, Zauner S (2005)

Unique tRNA introns of an enslaved algal cell,

Mol Biol Evol 22: 1694-1701.

Reviews und Buchartikel:

Kawach O, Sommer MS, Gould SB, Voss C, Zauner S, Maier U-G (2006).

Nucleomorphs: remnant nuclear genomes. In Genome Evolution in Eukaryotic Microbes,

Katz LA, Bhattacharya D (ed). Oxford: Oxford University Press.

Sommer MS, Gould SB, Kawach O, Klemme C, Voss C, Maier U-G, Zauner S (2006).

Photosynthetic organelles and endosymbiosis. In Genome Evolution in Eukaryotic Microbes,

Katz LA, Bhattacharya D (ed). Oxford: Oxford University Press.

Hjorth E, Hadfi K, Gould SB, Kawach O, Sommer MS, Zauner S, Maier U-G (2005).

Zero, one, two, three, and perhaps four. Endosymbiosis and the gain and loss of plastids.

Endocytobiosis Cell Res. 15, 459-468.

I. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium Persulfat	Nt	Nukleotid
Bp	Basenpaare	OD	Optische Dichte
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase Chain Reaction
ECL	Enhanced Chemiluminescence	PEG	Polyethylenglycol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PS	Photosystem
ER	Endoplasmatisches Retikulum	RNA	Ribonukleinsäure
EST	Expressed Sequence Tag	rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
GST	Gluthation-S-Transferase	RT	Raumtemperatur
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
HRP	Horseshoe Peroxidase	TCA	Trichloressigsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Kbp	Kilobasenpaare	TOF	Time Of Flight
KDa	Kilodalton	Tris	Tris (hydroxymethyl)-amino-methan
LHC	Light Harvesting Complex	Triton-X-100	Octaphenolpoly(ethylen-glycolether) _n
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation	Tween20	Poly(oxyethylen)-sorbitan-monolaurat
Mbp	Megabasenpaare	V	Volt
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure	Vol	Volumen
MPa	Megapascal	Wt	Wildtyp
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-galactopyranosid

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Schema der primären Endosymbiose.	1
Abb. 1-2:	Schema der sekundären Endosymbiose	5
Abb. 1-3:	Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung der Cryptophyte <i>G.theta</i>	6
Abb. 1-4:	Einteilung der auf dem Nukleomorph von <i>G.theta</i> codierten orfs in funktionelle Kategorien	7
Abb. 1-5:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 Zellen	10
Abb. 1-6:	Aufbau der Phycobiliprotein Disks	12
Abb. 1-7:	Schematische Darstellung eines an der Thylakoid Membran assoziierten Phycobilisomen in <i>Synechocystis</i>	13
Abb. 1-8:	Schematischer Aufbau von Phycobiliproteinen (A) und chromophoren Gruppen (B)	16
Abb. 1-9:	Struktur der Phycocyanin β -Untereinheit	17
Abb. 1-10:	Schematische Darstellung einer Ligationsreaktion	18
Abb. 2-1:	Schematische Darstellung des Slr1649 Proteins aus <i>Synechocystis</i> und homologer Proteine in eukaryoten Organismen	23
Abb. 2-2:	Schema des <i>knock-out</i> Konstrukts	26
Abb. 2-3:	Kontrolle der <i>slr1649 knock-out</i> Zellen	27
Abb. 2-4:	Western-Blot Analyse mit subfraktioniertem <i>Synechocystis</i> Gesamtprotein Extrakt aus Wt bzw. Δ slr1649 Zellen	27
Abb. 2-5:	TEM Aufnahme einer mit α -1649 behandelten <i>Synechocystis</i> Wt Zelle	28
Abb. 2-6:	Phänotypische Eigenschaften der Δ slr1649 Zellen	29
Abb. 2-7:	Spektroskopische Analyse der Δ slr1649 Zellen	30
Abb. 2-8:	Isolation und spektroskopische Analyse intakter Phycobilisomen	31
Abb. 2-9:	SDS-PAGE Analyse der isolierten Phycobilisomen	32
Abb. 2-10:	Auftrennung der Phycobilisomen Isolationen auf SDS-Gradienten Gelen (10 %-20 %)	33
Abb. 2-11:	Schematische Darstellung der Phycocyanin β -Untereinheit mit vorhergesagten Schnittstellen	34
Abb. 2-12:	Proteolytische Behandlung der Phycobilisomen	35
Abb. 2-13:	Schematische Darstellung des <i>pcv</i> Operons	36
Abb. 2-14:	Transkriptionsanalysen	37
Abb. 2-15:	Mit Protein gekoppelte Gluthation Sepharose Beads nach Inkubation mit Gesamt Extrakt	38

Abb. 2-16:	SDS-PAGE des GST <i>pull-down</i> Experiments	39
Abb. 3-1:	Darstellung der Phycobilisomenstruktur in Wt und eine, auf den hier generierten Daten basierende, mögliche Phycobilisomenstruktur in Δ slr1649 Zellen	47
Abb. 3-2	Phylogenetische Analyse des CpcT/Slr1649 Proteins	55

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1:	Vergleich der beiden Nukleomorph Genome von G.theta und B.natans	8
Tab. 2-1:	Homologe von Slr1649 in pro- und eukaryoten Organismen.	24
Tab. 2-2:	Gegenüberstellung des genomischen Kontext von homologen Genen der cpeT- und	25
Tab. 2-3:	In-silico Vorhersage der proteolytischen Fragmente aller Phycobiliproteine in	35
Tab. 2-4:	Ergebnisse der MALDI Analyse	39
Tab. 7-1:	Auflistung der Proteine mit cyanobakteriellen Homologen die auf dem	103
Tab. 7-2:	Auflistung der Proteine mit cyanobakteriellen Homologen, die auf dem	104

IV. Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	I
II	Abbildungsverzeichnis	II
III	Tabellenverzeichnis	III
IV	Inhaltsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Die Endosymbiosetheorie	1
1.1.1	Primäre Endosymbiose	1
1.1.2	Sekundäre Endosymbiose	3
1.2	Die Cryptophyte <i>Guillardia theta</i>	6
1.2.1	Das Nukleomorph	7
1.3	Cyanobakterien	9
1.3.1	Das Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	10
1.4	Phycobiliproteine und Phycobilisomen	11
1.4.1	Aufbau eines Phycobilisoms	11
1.4.2	Linker Proteine	14
1.4.3	Phycobiliproteine und chromophore Gruppen	15
1.4.3.1	Phycobilin Ligation	18
1.4.4	Phycobiliproteine in Cryptophyten	20
1.5	Aufgabenstellung	22
2	Ergebnisse	23
2.1	Das Slr1649 Protein von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	23
2.2	Knock-out des slr1649	26
2.3	Immunologische Experimente	27
2.4	Charakterisierung der Δ slr1649 Zellen	28
2.5	Analyse der Phycobilisomen	30
		IV

2.5.1 Isolation intakter Phycobilisomen	30
2.5.2 Gelelektrophoretische Analyse der Phycobilisomen	32
2.5.3 Proteolytische Behandlung der Phycobilisomen	33
2.5.4 Transkriptionsanalysen	36
2.6 Protein-Protein Interaktions-Assay mit Slr1649	38
2.6.1 GST-Pull-down Assay	38
3 Diskussion	40
3.1 Slr1649 ist ein lösliches Protein	41
3.2 Charakterisierung der Δslr1649 Zellen	41
3.3 Protein-Protein Interaktion des Slr1649	42
3.4 Isolation der Phycobilisomen	43
3.4.1 Spektroskopische Analyse der Phycobilisomen	44
3.4.2 SDS-PAGE Analyse der isolierten Phycobilisomen	45
3.4.2.1 Die Linker CpcC2 und CpcD	46
3.4.2.2 Das FNR Protein	48
3.4.2.3 Die Phycocyanin β -Untereinheit	48
3.5 Slr1649 – eine β-Cys155 Phycocyanobilin Lyase	51
3.6 Phylogenetische Analysen	53
3.6.1 Slr1649 Homologe in Cyanobakterien	54
3.6.2 CpeT, eine mögliche Phycoerythrobilin Lyase	56
3.6.3 Orf222/CpeT von <i>Guillardia theta</i>	57
4 Zusammenfassung	60
5 Methoden und Material	61
5.1 Material	61
5.1.1 Chemikalien	61
5.1.2 Standardpuffer und Lösungen	61
5.1.3 Membranen	61
5.1.4 Molekularbiologische Kits	61

5.1.5 Enzyme	62
5.1.6 Längenstandards	62
5.1.7 Oligonukleotide	63
5.1.8 Vektoren	64
5.1.9 Bakterienstämme	65
5.1.10 Hefestämme	65
5.1.11 Kulturmedien	65
5.1.11.1 <i>E.coli</i> Kulturmedium	65
5.1.11.2 <i>Guillardia theta</i> Kulturmedium (f/2-Medium)	66
5.1.11.3 Hefe Kulturmedium	67
5.1.11.4 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Kulturmedium (BG-11 Medium)	68
5.1.12 Geräte	69
5.1.12.1 PCR-Thermocycler	69
5.1.12.2 Sequenzierautomat	69
5.1.12.3 Zentrifugen	69
5.1.12.4 Power Supplies	70
5.1.12.5 Sonstige Geräte	70
5.1.12.6 Software	70
5.2 Methoden	71
5.2.1 Kulturbedingungen	71
5.2.1.1 Kulturbedingungen der Cryptophyte <i>Guillardia theta</i>	71
5.2.1.2 Kulturbedingungen der Hefestämme AH-109 und Y-187	71
5.2.1.3 Kulturbedingungen von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	71
5.2.2 Generelle molekularbiologische Methoden	71
5.2.2.1 Plasmid isolation aus <i>E.coli</i>	72
5.2.2.2 Plasmid isolation aus Hefe	72
5.2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> XL1Blue MRF'	73
5.2.2.4 Transformation von <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Zellen	73
5.2.2.5 Transformation von <i>Synechocystis</i> sp PCC6803 Zellen	73
5.2.3 Nukleinsäureanalytik	74
5.2.3.1 RNA-Isolation aus <i>Guillardia theta</i> und <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	74
5.2.3.2 Reverse Transkription	74
5.2.3.3 DNA-Isolation aus <i>Guillardia theta</i>	74
5.2.3.4 DNA-Isolation aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	75
5.2.3.5 Herstellung DIG-markierter Sonden	76
5.2.3.6 Northern-Blot und Southern-Blot Analysen	76
5.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	76

5.2.3.8 Elution von PCR Fragmenten	77
5.2.3.9 Ligation von DNA Fragmenten	77
5.2.3.10 DNA-Sequenzierung	77
5.2.4 Proteinanalytik	78
5.2.4.1 Überexpression rekombinanter Proteine	78
5.2.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	79
5.2.4.3 Nachweis von Proteinen mittels Coomassie Färbung	80
5.2.4.4 Semidry-Westernblotting	81
5.2.4.5 Immundetektion von Proteinen	81
5.2.4.6 Chloroform-Methanol Fällung	82
5.2.4.7 TCA Fällung	82
5.2.5 Proteinisolation	83
5.2.5.1 Proteinisolation aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	83
5.2.5.2 Proteinisolation aus <i>Guillardia theta</i>	83
5.2.6 Isolation intakter PBS aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	84
5.2.7 Elektronenmikroskopie	84
5.2.8 Protein-Interaktions Assays	85
5.2.8.1 Yeast-Two-Hybrid	85
5.2.8.2 GST-Pull-down	85
5.2.9 Pigmentanalysen in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Zellen	86
5.2.9.1 Chlorophyll Konzentrationsbestimmung	86
5.2.9.2 Phycocyanin Konzentrationsbestimmung	86
5.2.10 Proteolytische Assays	87
6 Literatur	88
7 Anhang	100
7.1 Aminosäure Alignment der CpeT-Gruppe	100
7.2 <i>Acession Numbers</i> der CpeT-Gruppe	101
7.3 Aminosäurealignment Slr1649 und Orf222	101
7.4 Aminosäurealignment der CpcT-Gruppe	102
7.5 <i>Acession Numbers</i> der CpcT-Gruppe	102
7.6 <i>Acession Numbers</i> des Stammbaums	103

7.7 Plastidenproteine auf Chromosom I des Nukleomorph von <i>Guillardia theta</i>	104
7.8 Plastidenproteine auf Chromosom II des Nukleomorph von <i>Guillardia theta</i>	105

1 EINLEITUNG

1.1 Die Endosymbiosetheorie

1.1.1 Primäre Endosymbiose

Wahrscheinlich traten erste Organismen mit rudimentären photosynthetischen Eigenschaften vor ca. 3,5 Mrd. Jahren auf (Schopf, 1993). Von diesem Zeitpunkt an entwickelten sich innerhalb von 1 Mrd. Jahren prokaryote Mikroorganismen, die den heutigen Cyanobakterien sehr ähnlich waren (De Marais, 2000; Nitschke *et al.*, 1998). Ungefähr 1 Mrd. Jahre später erschienen die ersten Eukaryoten, die Algen, welche sich durch den Besitz einer Plastide auszeichnen (Hedges *et al.*, 2004). Mereschowsky nahm aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale an, dass sowohl Plastiden wie

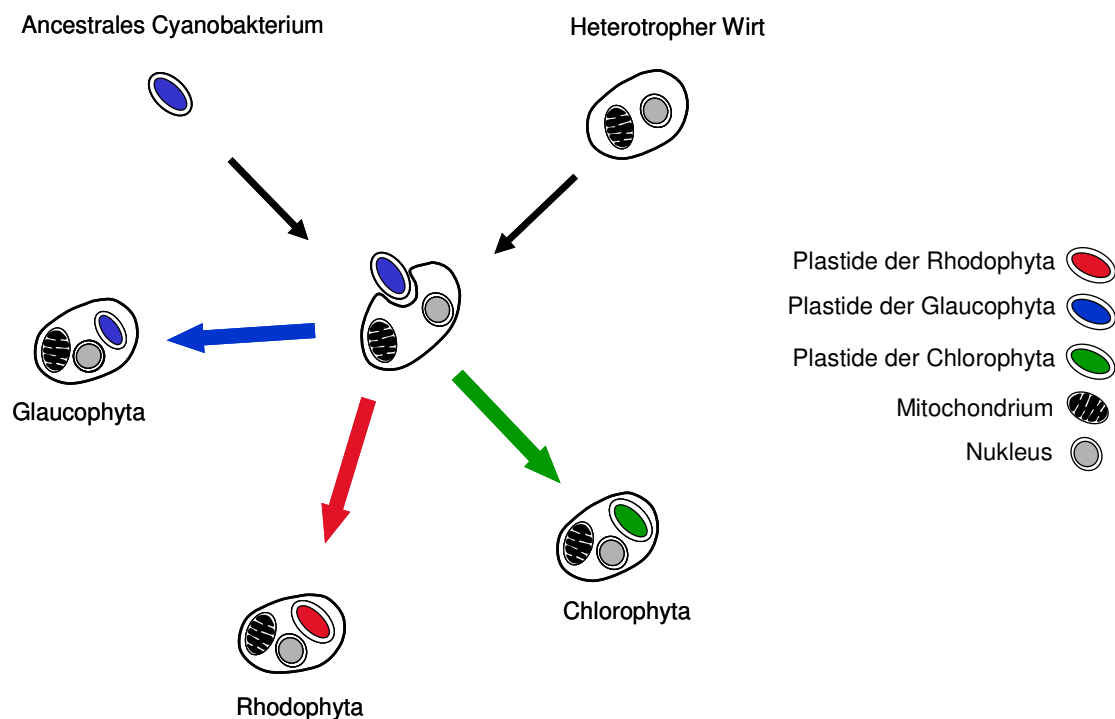


Abb. 1-1: Schema der primären Endosymbiose. Der Vorläufer eines heutigen Cyanobakteriums wird von einem heterotrophen Wirt, welcher bereits ein Mitochondrium besitzt, phagocytiert. Dieses monophyletische Ereignis führt im weiteren Verlauf zu drei Algengruppen: Den Glaucocystophyta (blau), den Rhodophyta (rot) und den Chlorophyta (grün). In allen drei Algengruppen besitzt die Plastide zwei Membranen.

auch heutige Cyanobakterien gemeinsame Vorläufer besitzen (Mereschkowsky, 1905, 1910). Diese Hypothese wurde durch die Entdeckung und Analyse des Plastoms, dem Genom der Plastiden, untermauert (Chun *et al.*, 1963; Ris und Plaut, 1962). Basierend auf diesen Daten formulierte Margulis die moderne Endosymbiontentheorie (Margulis, 1970).

Demnach geht die Entstehung photoautotropher Eukaryoten auf eine primäre Endosymbiose zurück. Dabei wurde ein phototropher Prokaryot durch einen heterotrophen Eukaryoten phagocytiert (Abb. 1-1). Der aufgenommene Prokaryot, ein Cyanobakterien-ähnlicher Organismus, wurde jedoch nicht metabolisiert, sondern im Wirtscytosol, zunächst in einer phagotrophen Vakuole, stabilisiert. Im Verlauf der Evolution kam es zu einer Etablierung des Symbionten als semiautonomes Organell, die Plastide, welche von zwei Membranen umgeben ist, dem *plastide envelope*. Die innere Membran leitet sich von der ehemaligen Plasmamembran des Cyanobakteriums ab. Die äußere Membran, die ehemalige Endosomenmembran besitzt hingegen eukaryote wie auch prokaryote Eigenschaften (Bolter *et al.*, 1998; Reumann *et al.*, 1999). In den Plastiden der Glaucocystophyta, auch Cyanellen genannt, befinden sich, im Unterschied zu den anderen Plastiden, noch Reste des bakteriellen Mureinsacculus zwischen den beiden Membranen.

Die Integration des Endosymbionten wurde einerseits durch massiven horizontalen Gentransfer vom Endosymbionten in den Wirts-Nukleus manifestiert (Martin und Herrmann, 1998; Martin *et al.*, 1998), andererseits kam es zu einem Verlust von redundanten Genen, die für ein Überleben des Endosymbionten in der Wirtszelle nicht mehr benötigt wurden, wie z.B. Gene für die Lipoprotein-Synthese (Kohler *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 2000). Das Ausmaß der Genomreduktion wird deutlich, wenn man Plastidengenome mit dem Genom eines frei lebenden Cyanobakteriums, wie z.B. *Synechocystis* sp. PCC6803, vergleicht. Plastome codieren für ca. 100-250 Proteine, wohingegen das Genom von *Synechocystis* sp. für ca. 3000 Proteine codiert (Kaneko *et al.*, 1996).

Aufgrund phylogenetischer Studien geht man davon aus, dass es sich bei der primären Endosymbiose um ein monophyletisches Ereignis handelte (Martin und Herrmann, 1998; Stoebe und Kowallik, 1999), in dessen Verlauf die Rhodophyta (Rotalgen), Chlorophyta (Grünalgen) und Glaucocystophyta entstanden sind. Neben diesen besitzen auch höhere Pflanzen einfache Plastiden.

Um die Funktion der Plastiden aufrecht zu erhalten, entwickelte sich ein effizientes

Protein-Transportsystem, welches die Translokation von Plastiden Proteinen, die im Nukleus des Wirts codiert werden, ermöglichte (Martin und Herrmann, 1998; Martin *et al.*, 1998). Dieser Transport wird über die beiden Protein-Komplexe Tic (*translocator of the inner membrane*) und Toc (*translocator of the outer membrane*), welche Kanäle im *plastide envelope* bilden, vermittelt (Soll und Schleiff, 2004).

Inzwischen wurde die Endosymbiontentheorie durch biochemische, morphologische und molekularbiologische Daten untermauert (Bhattacharya und Medlin, 1995; Cavalier-Smith, 1995; Gray, 1992).

1.1.2 Sekundäre Endosymbiose

Neben phototrophen eukaryoten Organismen mit einfachen Plastiden gibt es auch Gruppen mit sogenannten komplexen Plastiden. Als komplex bezeichnet man die Plastide dann, wenn sie von mehr als zwei Membranen umgeben ist. Entstanden sind diese Plastiden durch sekundäre Endosymbiose. Ähnlich der primären Endosymbiose handelte es sich beim Wirt sehr wahrscheinlich um einen heterotrophen Eukaryoten. In diesem Fall war jedoch der Endosymbiont kein ancestrales Cyanobakterium, sondern ein phototropher Eukaryot, welcher aus der primären Endosymbiose hervorgegangen war (Abb. 1-1) (Gibbs, 1978; Palmer, 2003).

Durch phylogenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die sekundäre Endosymbiose ein polyphyletisches Ereignis war (Douglas und Gray, 1991; Palmer, 2003; Van de Peer *et al.*, 1996). Komplexe Plastiden von Cryptophyten, Heterokontophyten, Haptophyten, Apicomplexa und Peridinin-haltigen Dinoflagellaten gehen auf eine Rhodophyte zurück, der Ursprung der komplexen Plastiden von Euglenophyten und Chlorarachniophyten hingegen auf eine Chlorophyte (Abb. 1-2). Im Laufe der Evolution fand eine Anpassung des Endosymbionten statt. Analog der primären kam es auch bei der sekundären Endosymbiose neben einem Transfer der genetischen Information in den Nukleus des Wirtes auch zu einem Verlust derselben. Kompartimente, wie z.B. Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus, gingen verloren (Douglas *et al.*, 2001). Zurück blieb eine komplexe Plastide mit drei bzw. vier Hüllmembranen, wobei die beiden Inneren Membranen (Membran drei und vier) dem *plastide envelope* entsprechen (siehe auch Abb. 1-3). Bei komplexen Plastiden mit vier Membranen leitet sich das äußere Paar vermutlich von der Cytoplasmamembran des phagocytierten Eukaryoten (Membran

zwei, auch periplastidäre Membran) bzw. von der Endosomenmembran des Wirtes ab (Membran eins).

Neben der, mit Ausnahme der Cryptophyta und der Chlorarachniophyta, vollständigen Reduktion des Endosymbionten-Nukleus ist in einigen Algengruppen auch die Anzahl der Membranen um die Plastide reduziert. So besitzen Euglenophyta und Peridinin-haltige Dinoflagellaten nur noch drei Hüllmembranen (Gibbs, 1978). Vier Membranen besitzen die Algengruppen der Cryptophyten, Haptophyten und Heterokontophyten (Gibbs, 1978). Die Gruppe der Apikomplexa, zu denen auch humanpathogene Parasiten, wie *Plasmodium falciparum* sowie *Toxoplasma gondii* zählen, nimmt hierbei eine Sonderstellung ein. Der so genannte Apicoplast besitzt zwar vier Membranen, ist aber nicht mehr photosynthetisch aktiv (McFadden *et al.*, 1996).

Wie bei den primären musste sich auch bei der sekundären Endosymbiose ein System entwickeln, welches die Proteine der meisten transferierten Gene in die Plastide zurück transportiert. Für Membran drei und vier wird das schon aus einfachen Plastiden bekannte Tic/Toc System (van Dooren *et al.*, 2000; Wastl und Maier, 2000), sowie für Membran eins das Sec61 System vermutet (Deane *et al.*, 2000; Gibbs, 1979; Liaud *et al.*, 1997). Das Translokationssystem der zweiten Membran ist noch unbekannt.

Im Gegensatz zu allen anderen komplexen Plastiden ist bei zwei Organismengruppen die Reduktion des Endosymbionten Nukleus nicht vollständig. Bei Cryptophyten und Chlorarachniophyten ist zwischen Membran zwei und drei, im periplastidären Kompartiment, das so genannte Nukleomorph erhalten geblieben (Abb. 1-2) (Douglas und Penny, 1999; Fraunholz *et al.*, 1997; Gilson und McFadden, 1997). Cryptophyten und Chlorarachniophyten besitzen somit vier unterschiedliche Genome (intertaxonische Kombination): Prokaryoten Ursprungs sind das Genom des Mitochondriums und das Genom der Plastide, eukaryoten Ursprungs das Genom des Nukleomorph und das des Nukleus der Wirtszelle (Gilson und McFadden, 1995).

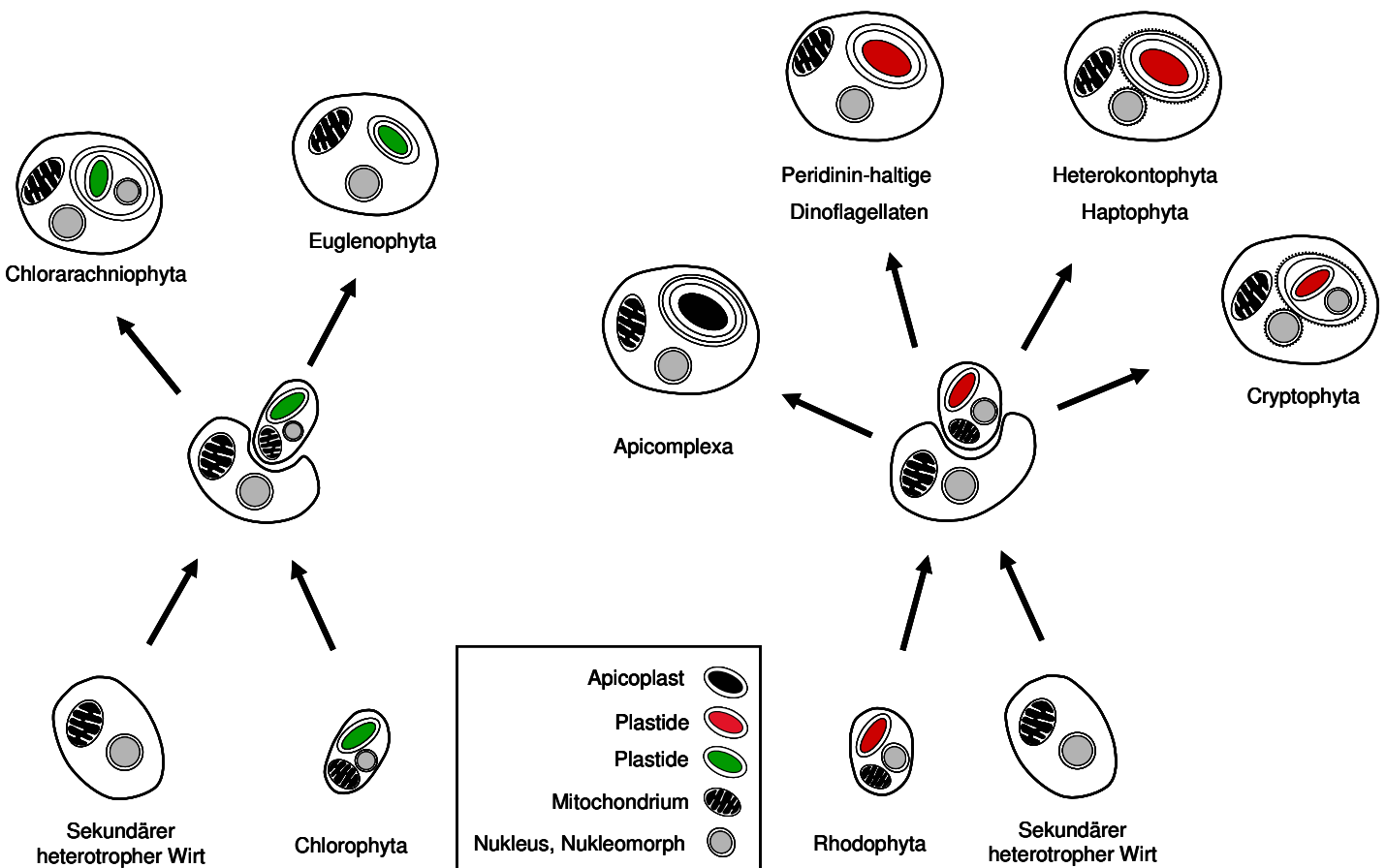


Abb. 1-2: Schema der sekundären Endosymbiose. Im Falle der grünen Linie war der Endosymbiont eine Chlorophyte. Aus diesem Endosymbioseereignis gingen die Chlorarachniophyten und Euglenophyten hervor. In der roten Linie war der Endosymbiont eine Rhodophyte. Hieraus entstanden die Cryptophyta, die Heterokontophyta, die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und die photosynthetisch nicht mehr aktiven Apicomplexa. Im Falle der Chlorarachniophyta und Cryptophyta befindet sich zwischen 2. und 3. Membran im periplastidären Kompartiment, das Nukleomorph.

1.2 Die Cryptophyte *Guillardia theta*

Guillardia theta (*G.theta*) gehört zur Gruppe der Cryptophyten. Diese einzellige Alge zeichnet sich, wie alle Cryptophyten, durch den Besitz einer komplexen Plastide und eines Nukleomorphs aus (Abb. 1-3). Die Zelle wird nach außen von der Cytoplasmamembran begrenzt. Ihr liegt von innen der Periplast, eine Proteinplattenschicht, auf. Des Weiteren besitzt *G.theta* zwei Geißeln, die einer tiefen Einbuchtung entspringen und der Fortbewegung dienen. Auffallend ist die becherförmige Plastide, die das Cytoplasma fast

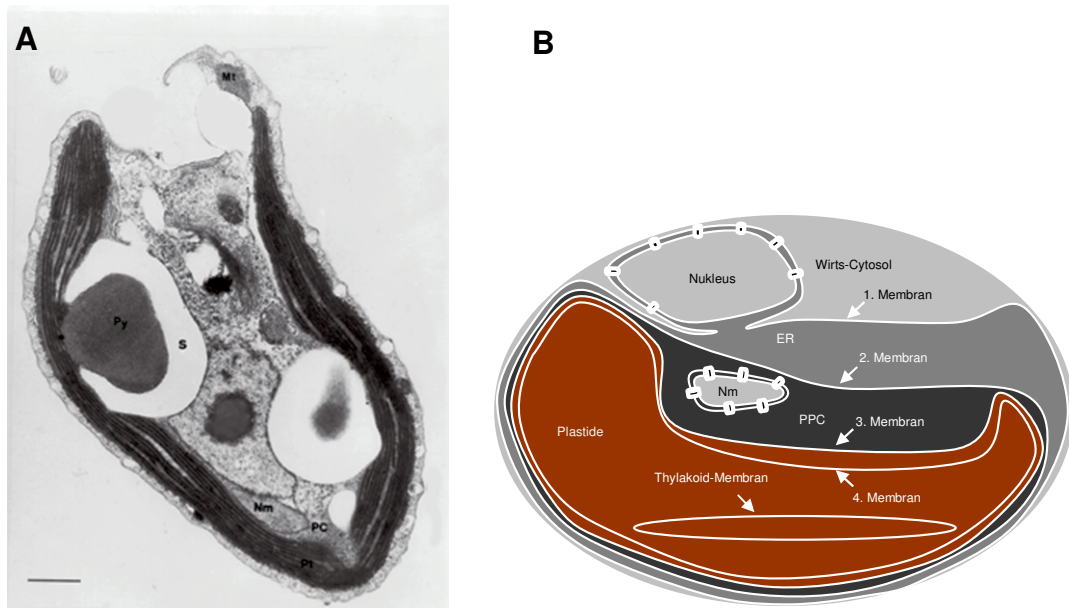


Abb. 1-3: Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung der Cryptophyte *G.theta*. (A) TEM Aufnahme von *G.theta*. S = Stärke, Py = Pyrenoid, Ej = Ejektosom, Nu = Nukleus, Nm = Nukleomorph, PC = periplastidäres Kompartiment, Mt = Mitochondrium. Balken = 1 µm.

(B) Schematische Darstellung von *G.theta*, insbesondere des Membransystems. ER = endoplasmatisches Retikulum, Nm = Nukleomorph, PPC = periplastidäres Kompartiment.

komplett zu umgeben scheint. Diese Plastide besitzt vier Membranen, wobei die äußere ein Kontinuum mit der Kernhüllmembran und der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) bildet (Hofmann *et al.*, 1994). Der Raum zwischen erster und zweiter Membran stellt somit das ER-Lumen dar, wobei die zweite Membran vermutlich aus der ursprünglichen Cytoplasmamembran des Endosymbionten entstanden ist (Cavalier-Smith, 2001). Zwischen zweiter und dritter Membran befindet sich das periplastidäre Kompartiment, welches auch das Nukleomorph beinhaltet, den stark reduzierten Nukleus

des Endosymbionten (Douglas *et al.*, 2001; Greenwood, 1974; Whatley *et al.*, 1979). Das Innere Membranpaar (Membran drei und vier) bildet den von einfachen Plastiden bekannten *plastide envelope* (Bolter *et al.*, 1998; Reumann *et al.*, 1999; Reumann und Keegstra, 1999).

Das periplastidäre Kompartiment stellt das verbliebene Cytoplasma des Endosymbionten dar und besitzt, charakteristisch für Eukaryoten, 80S Ribosomen (Gillot und Gibbs, 1980). Neben dem Nukleomorph und im Unterschied zu Plastiden der grünen Linie ist die Stärke im periplastidären Kompartiment lokalisiert (Cavalier-Smith, 2002; Douglas *et al.*, 2001). Andere Zellkompartimente, wie z.B. Mitochondrien, ER oder Golgi-Apparat, konnten bisher nicht identifiziert werden.

1.2.1 Das Nukleomorph

Das im periplastidären Kompartiment lokalisierte Nukleomorph von *G.theta* wurde erstmals 1977 von Greenwood beschrieben und stellt den stark reduzierten Nukleus des Endosymbionten dar (Greenwood *et al.*, 1977). Im Laufe der Evolution kam es durch Gentransfer und Genverlust zu einer Komprimierung des Nukleomorph Genoms (Douglas *et al.*, 1991; Maier *et al.*, 1991), welches durch ein Sequenzierprojekt vollständig entschlüsselt wurde (Douglas *et al.*, 2001). Das Genom des Nukleomorphs besitzt eine Gesamtgröße von 551 Kb und ist in drei linearen Chromosomen organisiert (Douglas *et al.*,

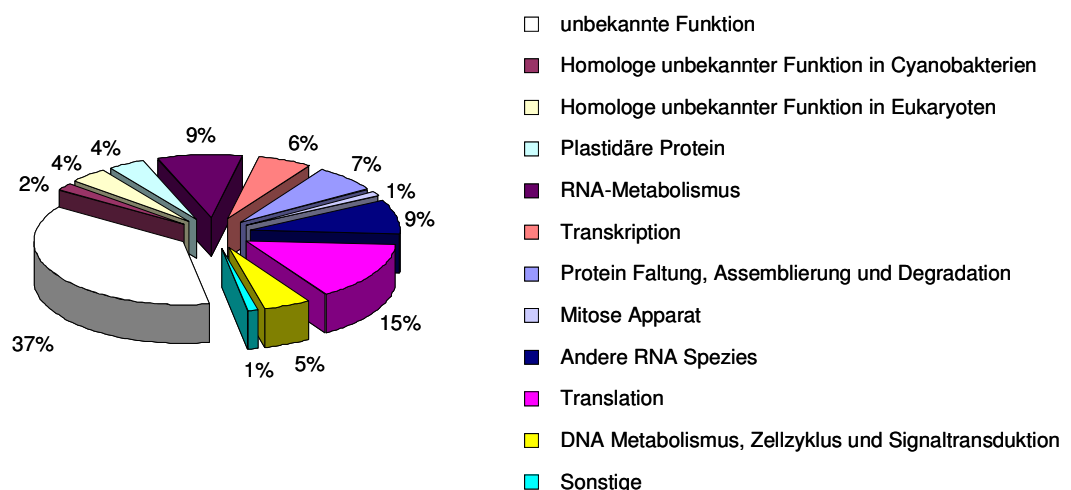


Abb. 1-4: Einteilung der auf dem Nukleomorph von *G.theta* codierten *orfs* in funktionelle Kategorien

2001; Eschbach *et al.*, 1991). Die Enden der drei Chromosomen bestehen aus *inverted repeats*, welche jeweils für eine 5S, 28 S, 5,8 S und 18 S rRNA codieren, die zur Gruppe der 47 nicht Protein-codierenden Gene des Nukleomorphs gezählt werden. Die *inverted repeats* schließen je Chromosom eine *single copy region* ein, in welcher sich die Protein codierenden Gene befinden (Zauner *et al.*, 2000). Die Gendichte beträgt ca. 1 Gen pro 1 kb (Douglas *et al.*, 2001).

Insgesamt sind auf dem Nukleomorph von *G. theta* 464 putativ Protein-codierende *open reading frames* (*orfs*) lokalisiert. 245 davon besitzen Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion. Der überwiegende Anteil dieser Proteine besitzt so genannte *house-keeping* Funktionen. Lediglich 19 *orfs* codieren für bekannte plastidär lokalisierte Proteine (Douglas *et al.*, 2001) (Tab. 7-1, Tab. 7-2, Abb. 1-4). Demgegenüber besitzen 219 Orfs keine bekannte Funktion, 31 davon jedoch Homologien zu Proteinen unbekannter Funktion in anderen Organismen (11 cyanobakteriellen (Tab. 7-1, Tab. 7-2), 20 eukaryoten Ursprungs). Viele andere für die Funktion der Plastide wichtigen Gene wurden im Zuge eines horizontalen Gentransfers in den Nukleus des Wirtes verlagert (Deane *et al.*, 2000).

Die kürzlich veröffentlichte Sequenz des Nukleomorphs der Chlorarachniophyte *Bigeloniella natans* (*B. natans*) lässt erstmals Vergleiche vollständiger Nukleomorph Genome der roten und grünen Linie zu (Gilson *et al.*, 2006). Dieses, ebenfalls aus drei Chromosomen bestehende und nur 372 Kb große Genom, unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht vom Nukleomorph der Cryptomonade *G. theta* (Tab. 1-1). Die Anzahl der auf ihm codierten Proteine liegt bei nur 331, wovon lediglich 17 als Plastiden-lokalisiert vorhergesagt werden (Gilson *et al.*, 2006). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass unter den 103 Genen mit

	Nukleomorph von <i>G. theta</i>	Nukleomorph von <i>B. natans</i>
Anzahl der Chromosomen	3	3
Größe (Kbp)	551	372
A/T Gehalt	74 %	>65 %
Anzahl der Gene	531	331
Gendichte (Gen/Kbp)	1	0,88

Tab. 1-1: Vergleich der beiden Nukleomorph Genome von *G.theta* und *B.natans*

unbekannter Funktion weitere Plastiden lokalisierte Proteine codiert sind. Im Vergleich zum Cryptophyten Nukleomorph fehlen z.B. α -, β - und γ -Tubulin (Keeling *et al.*, 1999). Trotz der deutlichen Komprimierung des Genoms zeigt der Nukleomorph von *B.natans* mit 3,3 Introns pro Gen eine sehr hohe Intron-Dichte (Gilson und McFadden, 1996). Der Cryptophyten Nukleomorph besitzt insgesamt nur 17 splicosomale Introns in Protein codierenden Genen (Douglas *et al.*, 2001), dafür jedoch eine starke Häufung der kleinsten bekannten Introns (3 Nt) in den für tRNAs codierenden Genen (Kawach *et al.*, 2005; Zauner *et al.*, 2000).

1.3 Cyanobakterien

Cyanobakterien sind die ältesten bekannten Organismen, welche oxygene Photosynthese betreiben. Sie besitzen eindeutig prokaryote Merkmale, wie z.B. fehlende Zellkompartimentierung und ein ringförmiges Genom. Cyanobakterien werden zur Gruppe der gram-negativen Bakterien gezählt, obwohl sich ihre Peptidoglycanschicht in Struktur und Dicke von der anderer gram-negativer Bakterien unterscheidet (Glauner *et al.*, 1988; Golden und Yoon, 1998; Jurgens *et al.*, 1983). Im Zuge der Evolution konnten Cyanobakterien aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit viele ökologische Nischen besetzen. So findet man sie heute nicht nur im Salz- und Süßwasser, sondern auch in extremen Habitaten, wie heißen Quellen, Gletschern und Wüsten (Whitten und Potts).

Cyanobakterien besitzen verschiedene Erscheinungsformen. Sie kommen als Einzeller (z.B. *Synechocystis* sp. PCC 6803), aber auch in Kolonien bildenden und fädigen Formen vor (z.B. *Anabaena variabilis*). Fossile Funde lassen darauf schließen, dass erste Cyanobakterien ähnliche Organismen vor 3,5 Mrd. Jahre auftraten (Schopf, 1993). Sie bildeten aufgrund ihrer photosynthetischen Aktivität den Anfang bei der Ausbildung der sauerstoffhaltigen Atmosphäre der Erde. Die ersten modernen Cyanobakterien traten vor ca. 2,7 Mrd. Jahren auf. Sie konnten sich aufgrund ihrer weiter entwickelten Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese gegenüber anderen Mikroorganismen durchsetzen (De Marais, 2000; Nitschke *et al.*, 1998). Dies geschah nicht allein aufgrund der energetischen Vorteile der Photosynthese, sondern auch begünstigt durch das Endprodukt der Photosynthese selbst, dem Sauerstoff, welcher von den Cyanobakterien in die Umgebung abgegeben wurde und für viele konkurrierende Spezies toxisch war. Innerhalb von 1 Mrd. Jahre nach Auftreten

der ersten Cyanobakterien stieg der O₂-Gehalt der Erdatmosphäre auf ein Viertel des heutigen an. Mit dem Erscheinen weiterer photosynthetischer Organismen, wie den Algen (vor 1,2 Mrd. Jahren) und Landpflanzen (vor 500 Mio. Jahren), entstand die Atmosphäre, wie wir sie heute kennen (Xiong und Bauer, 2002).

Den meisten Cyanobakterien gemeinsam sind die Thylakoide, welche ein internes Membransystem bilden. Für *Synechocystis* sp. PCC6903 konnte gezeigt werden, dass die Thylakoide kein Kontinuum mit der Cytoplasmamembran bildet (Liberton *et al.*, 2006). Eine Ausnahme stellt das Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 dar. Es besitzt keine Thylakoidmembran, weshalb der gesamte Photosyntheseapparat in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist (Rippka *et al.*, 1974). Somit finden oxidative Photosynthese und Respiration in ein und derselben Membran statt.

1.3.1 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803

Synechocystis sp. PCC6803 (*Synechocystis*) ist ein einzelliges Cyanobakterium, welches im Süßwasser zu finden ist (Abb. 1-5). Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis*, des ersten Cyanobakteriums überhaupt, wurde 1997 abgeschlossen (Kaneko *et al.*, 1996). Es ist, wie bei allen Prokaryoten, zirkulär und besteht aus 3,57 Mbp, auf denen 3168 Gene codiert sind. Durch vergleichende Sequenzanalysen konnten mehr als 50 % der Gene einer Funktion zugeordnet werden (Kaneko *et al.*, 1996). Die Fähigkeit, Fremd-DNA aufzunehmen und durch homologe Rekombination stabil in das eigene Genom zu

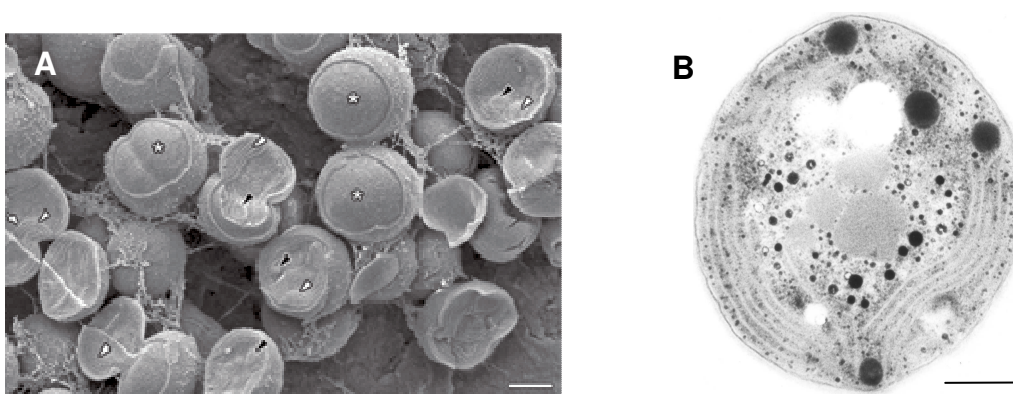


Abb. 1-5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Synechocystis* sp. PCC6803 Zellen. (A) Kryo-SEM (Scanning electron microscopy) Schnitte von *Synechocystis* Zellen. Nur oberflächlich aufgebrochene Zellen sind durch weiße Sternchen markiert. Weiße Dreiecke markieren Thylakoidmembranen, schwarze Dreiecke deuten auf Einschlüsse. (Balken = 500 nm) (van de Meene *et al.*, 2006). (B) TEM Aufnahme einer *Synechocystis* Zelle. Gut zu erkennen sind die fädig erscheinenden Thylakoidmembranen (Balken = 400 nm).

integrieren, machen dieses Cyanobakterium zu einem hervorragenden Modellorganismus, um die Funktion von insbesondere in die Photosynthese involvierten Genen zu untersuchen (Gregorieva und Shestakov, 1982).

1.4 Phycobiliproteine und Phycobilisomen

Phycobiliproteine sind die Antennenpigmente von Cyanobakterien, Rotalgen, Glaucophyten und Cryptophyten. Sie dienen der Lichtsammlung und Lichtweiterleitung zu den Photosystemen.

Die Absorptionsmaxima dieser Pigmente liegen in der Grünlücke des Chlorophylls, also dem Bereich zwischen 500 nm und 650 nm, in dem das Licht von Chlorophyll nur wenig bis gar nicht absorbiert wird. Somit steht Phycobiliprotein-haltigen Organismen eine größere Bandbreite des sichtbaren Lichtspektrums für die Photosynthese zur Verfügung. Phycobiliproteine sind in Cyanobakterien und Rotalgen in Phycobilisomen organisiert, einem Multiproteinkomplex, der der Thylakoidmembran auf der stromalen Seite aufliegt. In Cryptophyten befinden sich die Phycobiliproteine dagegen scheinbar unorganisiert im Thylakoidlumen.

1.4.1 Aufbau eines Phycobilisoms

Aufgrund der in Kap. 1.4.3 beschriebenen Eigenschaften der Phycobiliproteine wurde schon früh eine bestimmte Anordnung in höheren Aggregaten vermutet, da diese eine effizientere Absorption und Weiterleitung der Lichtenergie ermöglicht. Bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts konnten sowohl Duysens, wie auch French und Young durch Arbeiten an Rotalgen und Cyanobakterien zeigen, dass Anregung des Phycoerythrin bzw. Phycocyanin eine stärkere Chlorophyllemission zur Folge hatte als eine Anregung des Chlorophylls selbst (Duysens, 1951; French und Young, 1952). Dies legte die Vermutung einer direkten Kopplung von Phycobiliproteinen und Chlorophyll nahe. Weiteren Aufschluss über die Anordnung und die Lokalisation der Phycobiliproteine brachten jedoch erst die Arbeiten von Gantt et al. (Gantt und Conti, 1965, 1966a, b). Sie konnten anhand von Experimenten mit der Rotalge *Porphyridium cruentum* zeigen, dass sich die Phycobiliproteine in Granula-ähnlichen Strukturen auf der Außenseite der Thylakoidmembran befinden. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten weiter, dass

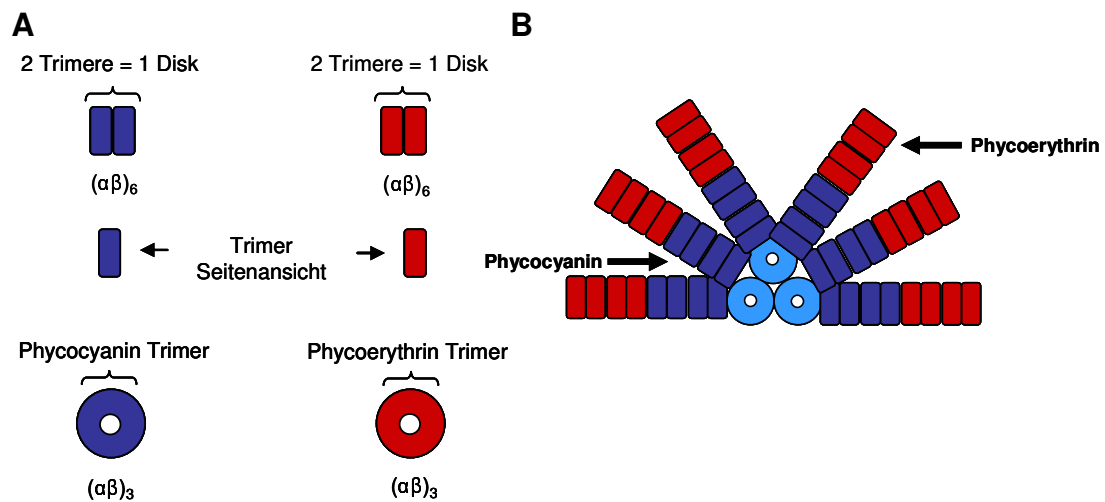


Abb. 1-6: Aufbau der Phycobiliprotein Disks (A) und eines Phycobilisoms (B). (A) Schematische Darstellung der Untereinheiten einer Phycocyanin (Blau), bzw. Phycoerythrin (Rot) Disk. Die kleinste Untereinheit ist das „Monomer“, ein aus α - und β -Untereinheit bestehendes Heterodimer. Diese lagern sich zu Trimeren zusammen, welche eine ringähnliche Struktur, mit einer Aussparung in der Mitte bilden. Die eigentliche Disk besteht aus zwei Trimeren (Hexamer).

(B), Wenn Phycoerythrin und Phycocyanin in einem Organismus vorhanden sind, liegen die Phycoerythrin Disks den Phycocyanin Disks immer auf. Den trizylindrischen Core bildet Allophycocyanin (Hellblau).

diese Granula einen Durchmesser von 30-40 nm besitzen und in einem Abstand von 40- bis 50 nm auf der Membran angeordnet sind. Aufgrund ihrer Charakteristika nannte sie Gantt Phycobilisomen (Gantt und Conti, 1966b).

Durch vergleichende Untersuchungen von *Porphyridium cruentum* und *Porphyridium aeruginum* konnten, aufgrund ihrer Erscheinungsform, zwei Arten von Phycobilisomen unterschieden werden: Hemi-discoidale und Hemi-ellipsoidale (Gantt und Conti, 1966b). Hemi-ellipsoidale Phycobilisomen können hierbei als zwei dicht beieinander liegende hemi-diskoidale Phycobilisomen angesehen werden (Lange *et al.*, 1990a; Lange *et al.*, 1990b). Phycobilisomen wurden auch in einer Reihe anderer Organismen identifiziert, so z.B. in den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* und *Glaucozystis nostochinearum* (Lefort, 1965), aber auch in den Cyanobakterien, wie z.B. *Synechococcus lividus* (Edwards und Gantt, 1971; Wildman und Bowen, 1974). Im Falle der Cyanobakterien stellte sich heraus, dass die Phycobilisomen der meisten Mitglieder dieser Organismengruppe zum hemi-discoidalen Typ gehören (Wildman und Bowen, 1974).

Auch die Substruktur der Phycobilisomen konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie geklärt werden (Kap. 1.4.3), (Berns und Edwards, 1965; Gantt und Conti, 1966a; Kessel *et al.*, 1973). Für die Disks der einzelligen Rotalge *Rhodella violacea*, bestehend aus Phycocyanin

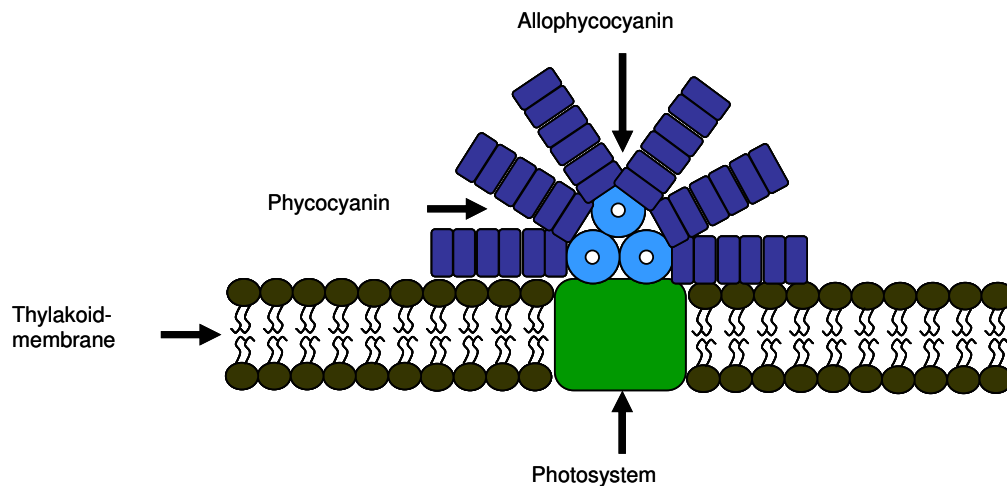


Abb. 1-7: Schematische Darstellung eines an der Thylakoid Membran assoziierten Phycobilisoms in *Synechocystis*. Die Rods der Phycobilisomen in *Synechocystis* bestehen nur aus Phycocyanin. Diese sind an den aus Allophycocyanin bestehenden trizylindrischen Core gekoppelt. Das gesamte Phycobilisom interagiert mit der Thylakoid Membran über ApcE Linker

und Phycoerythrin, konnte nach Analyse der Phycobilisomen gezeigt werden, dass sie mit drei zylindrischen Elementen assoziiert sind. Neben diesem tri-zylindrischen Typ, welcher auch bei Phycobilisomen anderer Organismen nachgewiesen werden konnte (Bryant *et al.*, 1979; Rosinski *et al.*, 1981; Yamanaka *et al.*, 1980), existieren auch bi- bzw. penta-zylindrische Anordnungen (Ducret *et al.*, 1996; Ducret *et al.*, 1998; Sidler, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Elementen um Allophycocyanin handelt (Bryant *et al.*, 1976; Koller *et al.*, 1977). Die unterschiedlichen Allophycocyanin Anordnungen, auch Core genannt, werden zur Klassifizierung des Phycobilisoms genutzt (bi-, tri-, oder penta-zylindrisch).

Zusammenfassend ergab sich, basierend auf strukturellen, spektroskopischen und physiologischen Daten für tri-zylindrische hemi-diskoidale Phycobilisomen, wie sie in vielen Cyanobakterien vorkommen, folgendes Modell:

Das Innerste der Phycobilisomen stellen drei Allophycocyanin-Zylinder dar. An diese assoziiert findet man mehrere Disks, bestehend aus Phycocyanin, welche die sogenannten Rods bilden. Wenn vorhanden, liegen die Phycoerythrin-Disks den Phycocyanin-Disks immer auf (Abb. 1-6, Abb. 1-7). In einigen Cyanobakterien ist das Phycoerythrin durch Phycoerythrocyanin ersetzt worden. Länge und Zusammensetzung der Rods variieren stark und hängen unter anderem von der Phycobiliprotein-Ausstattung des Organismus und den Lichtbedingungen (chromatische Adaption) ab. Alle Komponenten der Rods und des

Cores werden durch meist farblose Linker Proteine verbunden (de Marsac und Cohen-Bazire, 1977). Auch die Assoziation der Phycobilisomen an die Thylakoidmembran wird durch Linker Proteine vermittelt.

Phycobilisomen sind die Lichtsammelkomplexe sowohl für Photosystem I (PS I) wie auch für Photosystem II (PS II). Die frühere Annahme, dass diese ausschließlich an PS II zu finden sind, wurde durch Mullineaux et al. widerlegt (Mullineaux, 1992, 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Phycobilisomen und Photosysteme keine stabile Interaktion eingehen, sondern vielmehr die Phycobilisomen als Ganzes ständig die Position auf der Thylakoidmembran wechseln, während die Photosysteme immobil sind (Sarcina *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass diese Mobilität durch die Art der Interaktion, ähnlich dem Spektrin der Erythrocythen (Sarcina *et al.*, 2001), zwischen Linker und Lipiden in der Thylakoidmembran ermöglicht wird.

1.4.2 Linker Proteine

Im Gegensatz zu den Phycobiliproteinen wurden Linker Proteine erst spät bei gelelektrophoretischen Analysen isolierter Phycobilisomen aus Cyanobakterien entdeckt (de Marsac und Cohen-Bazire, 1977). Weitere Untersuchungen zeigten, dass zwischen 12 % und 15 % aller Proteinbestandteile eines Phycobilisoms Linker sind und diese, im Unterschied zu Phycobiliproteinen, basische Eigenschaften besitzen (Lundell *et al.*, 1981). Ihre Aufgabe besteht einerseits in der strukturellen Stabilisierung der Phycobilisomen und andererseits in der Optimierung ihrer Eigenschaften bezüglich Absorption und Energieweiterleitung. Sie verbinden sowohl die Disks der Rods untereinander wie auch die Rods mit dem Core. Die Komponente mit der größten molekularen Masse innerhalb eines Phycobilisoms, der Linker ApcE, bildet die Verbindung zwischen dem Core und der Thylakoidmembran.

Linker werden entsprechend ihrer Lokalisation und Masse durch bestimmte Zahlen und Buchstaben abgekürzt. Die Lokalisationsmöglichkeiten sind: R = Rod, RC = Rod-Core, C = Core, CM = Core-Membrane. Stellt man den Buchstaben die entsprechende molekulare Massenzahl zur Seite, ist der Linker eindeutig definiert. So ist zum Beispiel L_{RC}^{27} der Rod-Core Linker mit der Masse 27 kDa (Glazer, 1985).

Untersuchungen ergaben, dass die Interaktion zwischen Linker und Phycobiliprotein-Disk im inneren Hohlraum, den alle Trimer bzw. Hexamerstrukturen besitzen, stattfindet.

Hierbei wirken die unterschiedlichen Ladungen zwischen Phycobiliproteinen (negativ) und Linker Proteinen (positiv) unterstützend, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Interaktionen dieser beiden Proteinklassen sowohl auf hydrophoben Wechselwirkungen wie auch auf unterschiedlichen Ladungszuständen beruhen (Füglister *et al.*, 1984; Glauser *et al.*, 1992; Wilk *et al.*, 1999).

Die Ausstattung eines Phycobilisoms mit Linkern bzw. die genaue Masse der Linker variiert in den unterschiedlichen Organismen.

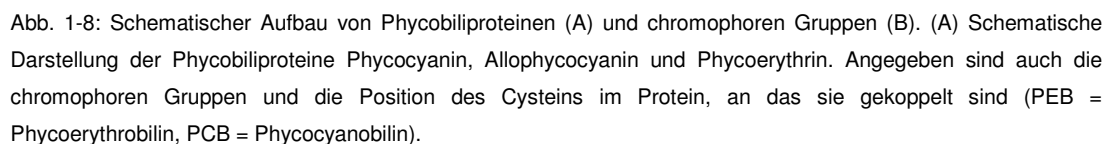
Verglichen mit den Phycobiliprotein α - und β -Untereinheiten sind die Aminosäuresequenzen der Linker Proteine weit weniger konserviert (Liu *et al.*, 2005), (Kap. 1.4.3). Trotzdem besitzen Rod-Core, Rod und Core-Membran Linker im N-Terminus konservierte Bereiche (Glauser *et al.*, 1992). Diese sind vermutlich für die Interaktion mit den Phycobiliproteinen bzw. den Linkern untereinander verantwortlich.

Einige Linker tragen selbst Phycobiline und sind somit streng genommen Phycobiliproteine. Das oben bereits erwähnte Linker Protein ApcE gehört ebenso dazu wie die γ -Untereinheiten der Phycoerythrine aus Rotalgen, welche ebenfalls Linker Funktion besitzen.

1.4.3 Phycobiliproteine und chromophore Gruppen

Die Entdeckung der Phycobiliproteine geht zurück in das Jahr 1836 (Esenbeck, 1836), jedoch erst 1843 gab Kützing den farbigen Substanzen aus dem Cyanobakterium *Oscillatoria* sp. die heute noch gebräuchlichen Namen Phycocyanin und Phycoerythrin, ehe 1877 Sorby ein weiteres Biliprotein, das Allophycocyanin, entdeckte (Kützing, 1843; Sorby, 1877). Erst 1910 zeigte Kylin, dass die Phycobiliproteine neben dem Protein noch aus einem assoziierten Pigment bestehen (Kylin, 1910). Diese Pigmente, auch chromophore Gruppe genannt, konnten von Lemberg der Klasse der Biline zugeordnet werden (Lemberg, 1930). Um Phycobiliproteine bezüglich ihrer Herkunft genauer zu klassifizieren, werden Präfixe angefügt. Diese Präfixe leiten sich für Phycocyanin und Phycoerythrin von der Organismengruppe ab, aus der sie zuerst isoliert und analysiert wurden. Somit steht z.B. C für Cyanobakterium und R für Rotalge. So ist C-Phycocyanin, welches auch in *Synechocystis* vorkommt, erstmals in einem Cyanobakterium entdeckt worden; R-Phycocyanin dagegen erstmals in Rotalgen.

Untersuchungen der 60er und 70er Jahre des letzten Jahrhunderts zeigten, dass Monomere



16

wobei diese Disks jeweils aus zwei Trimeren bestehen ($\alpha_6\beta_6$), welche sich aneinander lagern. Disks besitzen einen Durchmesser von 10-12 nm und eine Dicke von 5-6 nm (Abb. 1-6). Insbesondere beim Phycoerythrin der Rotalgen sind durch die γ -Untereinheiten auch Hexamer-ähnliche Strukturen möglich. Allophycocyanin dagegen, welches auch aus α - und β -Untereinheiten besteht, kommt nur in Trimeren ($\alpha_3\beta_3$) bzw. Trimer-ähnlichen Strukturen vor. Letztere entstehen durch verschiedene Kombinationen der Allophycocyanin Untereinheiten mit weiteren Core spezifischen Komponenten, wie ApcE, β^{16} und α^B . Dem ApcE Linker kommt neben der Interaktion mit der Thylakoidmembran noch eine weitere Aufgabe als terminaler Emitter zu. Zusammen mit den Core Komponenten α^B und β^{16} ist er für eine effiziente Weiterleitung der Lichtenergie auf das Chlorophyll a der Photosysteme zuständig (MacColl, 2004).

Allen Phycobiliprotein-Monomeren gemein ist ihre Sekundärstruktur. Sie bestehen aus acht Helices, wobei Helix A-H eine Globin-Domäne bilden und Helix X und Y die Interaktion

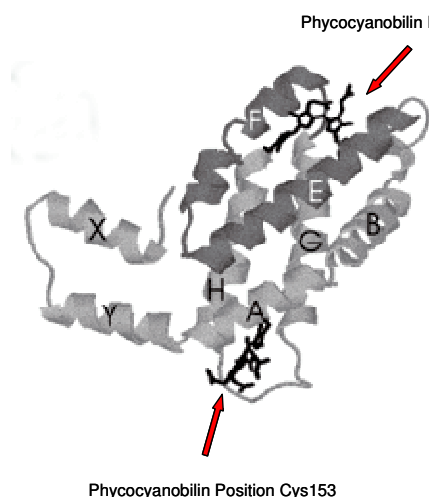


Abb. 1-9: Struktur der Phycocyanin β -Untereinheit. Die acht Helices sind durch Buchstaben gekennzeichnet. Helix X und Y sind für die Interaktion mit der Phycocyanin α -Untereinheit verantwortlich, Helix A-H bildet den globulären Anteil des Proteins. Die chromophoren Gruppen, Phycocyanobilin, befinden sich zwischen Helix E und F ($\beta 82$, oberer Pfeil) und Helix G und H ($\beta 153$, unterer Pfeil). Letztere Bilin-Gruppe wird aufgrund ihrer exponierten Position im späteren Heterodimer auch als peripheres Bilin bezeichnet (Toole *et al.*, 1998).

mit der zweiten Untereinheit vermitteln (Abb. 1-9). Diese Struktur ist auch von Phytochromen bekannt, was einen möglichen gemeinsamen Vorläufer vermuten lässt (Apt *et al.*, 1995; Pastore und Lesk, 1990; Schirmer *et al.*, 1985).

Im Unterschied zu den Linker Proteinen entstanden die verschiedenen Phycobiliprotein-Untereinheiten wahrscheinlich in drei Duplikationsschritten aus einem ursprünglich solitären Phycobiliprotein oder Phycobiliprotein-ähnlichen Gen (Apt *et al.*, 1995) (Kap. 1.4.2). Ausgenommen hiervon sind die Phycobiliprotein α -Untereinheiten in Cryptophyten, welche sich deutlich von allen anderen bekannten Untereinheiten unterscheiden (Kap.

1.4.4). Eine Duplikation des ancestralen Phycobiliprotein-Gens führte zu den α - und β -Untereinheiten. Aus diesem Paar entstanden wiederum die Phycobiliprotein-Untereinheiten für den Core, Allophycocyanin sowie für die Rods. Innerhalb der Gene, welche für Phycobiliproteine der Rods codierten, kam es zu einer weiteren Verdoppelung, die zu Phycocyanin und Phycoerythrin führte.

An allen Untereinheiten der Phycobiliproteine findet man Biline. Darüber hinaus besitzen auch einige Linker-Proteine Biline. Vier verschiedene Bilingruppen sind heute vor allem in Cyanobakterien und Rotalgen bekannt: Phycocyanobilin, Phycoerythrobilin, Phycourobilin und Phycoviolobilin (Abb. 1-8). Weitere fünf kommen nur in Cryptophyten vor. Biline bestehen aus offenen Tetrapyrolringen, welche über Thioether-Bindungen kovalent mit dem Apo-Protein verknüpft sind (Beuhler *et al.*, 1976; Crespi und Smith, 1970; Lagarias *et al.*, 1979; Schoenleber *et al.*, 1984). Dabei erfolgt die Ligationsreaktion immer an konservierten Cysteinen des Apo-Proteins (Köst-Reyes *et al.*, 1975; Muckle *et al.*, 1978).

1.4.3.1 Phycobilin Ligation

Phycobiline sind eng mit den Phytochromobilinen verwandt, den chromophoren Gruppen der pflanzlichen Phytochrome. Diese besitzen im N-Terminus einen Bereich mit Bilin-Lyase Funktion, wodurch die Ligrationsreaktion an das entsprechende Cystein des

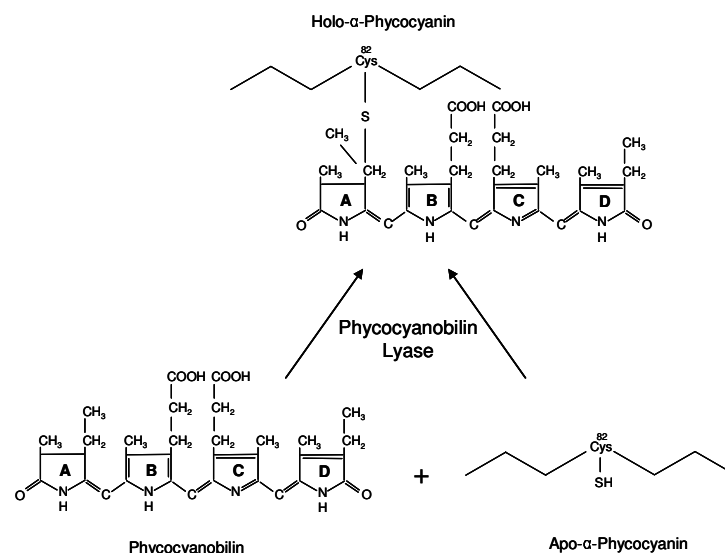


Abb. 1-10: Schematische Darstellung einer Ligationsreaktion. Ligationsreaktion am Beispiel der $\alpha 82$ Phycocyanin Phycocyanobilin Lyase (Tooley *et al.*, 2001).

Apo-Proteins autokatalytisch vermittelt wird (Wu und Lagarias, 2000). Analog funktioniert die Ligationreaktion für ApcE, dem Core-Membrane Linker Protein, welches ebenfalls N-terminal eine Lyase-Domäne besitzt (Zhao *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu anderen Phycobiliproteinen gelang auch für die α -Untereinheit des Allophycocyanins der Nachweis autokatalytischer Aktivität (Hu *et al.*, 2006).

Auch andere Phycobiliproteine besitzen die Fähigkeit zur autokatalytischen Ligation, jedoch nur mit sehr geringer Effizienz (Arciero *et al.*, 1988a, b). Im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen benötigen sie spezielle Enzyme, welche die Ligationreaktion vermitteln, die Phycobilin-Lyasen (Abb. 1-10).

Als erste Lyase überhaupt wurde eine Phycocyanobilin-Lyase in *Synechococcus* sp. PCC 7002, identifiziert (Fairchild *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992). Dieses Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten CpcE und CpcF, vermittelt die Ligation eines Phycocyanobilin an Position Cys84 der α -Untereinheit des Phycocyanin (α 84 Phycocyanin Phycocyanobilin Lyase). Homologe dieser Lyase gibt es in verschiedenen Phycocyanin-haltigen Cyanobakterien. Darüber hinaus zeigte sich, dass diese Ligationreaktion sehr spezifisch ist, weshalb man für jede Bilin-Position in den verschiedenen Phycobiliproteinen eine eigene Lyase postuliert (Fairchild *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1992). Jung *et al.* konnten eine weitere Lyase in *Anabaena variabilis*. PCC 7120 identifizieren, welche aus den Untereinheiten PecE und PecF aufgebaut ist (Jung *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2000). Diese Lyase unterscheidet sich jedoch von der oben genannten Lyase aus *Synechococcus* sp. PCC 7002. Parallel zur Ligation von Phycocyanobilin an Position Cys84 der Phycoerythrocyanin α -Untereinheit vermittelt sie zusätzlich die Umwandlung dieses Phycocyanobilins zu Phycoviolobilin, weshalb es sich hier um ein Lyase-Isomerase Enzym handelt (Storf *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2000).

Eine neue Klasse von Lyasen sind die β 84 Phycocyanin-Phycocyanobilin-Lyasen (Shen *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006a). Diese funktionieren im Gegensatz zu den bisher bekannten α 84 Phycocyanobilin Lyase als Monomere. Weiterhin sind es die ersten Lyasen, welche die Ligation einer chromophoren Gruppe an die β -Untereinheit eines Phycobiliproteins vermitteln.

Die bisher beschriebenen Lyasen sind in ihrer Funktion spezifisch für Phycocyanin oder Phycoerythrocyanin. Phycoerythrin spezifische Lyasen sind bisher nicht bekannt. Eine Ausnahme stellen die in *Calothrix* sp. identifizierten Gene *cpeY* und *cpeZ* dar (Kahn *et al.*, 1997). Die von diesen Genen codierten Proteine zeigen Homologien zur CpcE-

Untereinheit der Phycocyanobilin Lyase CpcE/CpcF (Sidler, 1994; Wilbanks und Glazer, 1993). Darüber hinaus zeigen Insertionsmutanten dieser Gene Phänotypen, welche auf eine mögliche Lyase-Funktion schließen lassen können, wie z.B. reduzierter Phycoerythrin-Gehalt oder in der Masse reduzierter β -Untereinheit (Kahn *et al.*, 1997).

1.4.4 Phycobiliproteine in Cryptophyten

Cryptophyten besitzen in ihrer komplexen Plastide als akzessorische Pigmente neben Chlorophyll a und einem Phycobiliprotein auch Chlorophyll c_2 (Glazer, 1983). Im Unterschied zu frei lebenden Rotalgen weisen Cryptophyten bezüglich der Phycobiliproteine einige Unterschiede auf.

So findet man diese nicht in Phycobilisomen organisiert auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran, sondern im Thylakoidlumen, wo sie einen scheinbar ungeordneten Aufbau zeigen (Dodge, 1969; Gantt *et al.*, 1971). Sie besitzen pro Organismus nur eine Klasse von Phycobiliproteinen, entweder nur Phycoerythrin oder nur Phycocyanin (Glazer und Wedemayer, 1995; Wedemayer *et al.*, 1996). Allophycocyanin fehlt in Cryptophyten gänzlich.

Sieben Phycobiliproteine, welche nicht aus Rotalgen oder Cyanobakterien bekannt waren, konnten in verschiedenen Cryptophyten identifiziert werden: Drei Phycoerythrine-Klassen (PE 545, 555 und 566) und vier Phycocyanin-Klassen (PC 596, 612, 630 und 645) (Hill und Rowan, 1989; O'Heocha und Raftery, 1959), wobei die Ziffern im Phycobiliproteinnamen für die Absorptions-Maxima stehen. Diese Cryptophyten-spezifischen Biliproteine werden u. a. durch vier Phycobiline ermöglicht, welche in Rotalgen und Cyanobakterien nicht vorkommen: 15,16 Dihydrobiliverdin, Bilin 584, Bilin 618 und Mesobiliverdin (Wedemayer *et al.*, 1996).

Trotz der Heterogenität bezüglich ihrer Ausstattung ist die Anzahl der chromophoren Gruppen je Phycobiliprotein-Untereinheit sowohl bei Phycoerythrin, wie auch bei Phycocyanin gleich: Die α -Untereinheit trägt immer ein Bilin, die β -Untereinheit drei. Cyanobakterien und Rotalgen besitzen demgegenüber an der β -Untereinheit des Phycocyanin nur zwei Phycocyanobiline.

Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass β -Untereinheiten sowohl von Phycocyanin wie auch Phycoerythrin Homologien zu β -Untereinheiten des Phycoerythrin der Rotalgen besitzen (Glazer und Apell, 1977; Sidler *et al.*, 1990). Somit wird angenommen, dass die

Apo- β -Untereinheiten aller Phycobiliproteine in Cryptophyten aus den Phycoerythrin β -Untereinheiten der Rotalgen entstanden sind (Sidler und Zuber, 1988). Im Gegensatz dazu besitzen die α -Untereinheiten keinerlei Homologien zu anderen Phycobili- oder Linker Proteinen (Sidler *et al.*, 1990), ausgenommen andere α -Untereinheiten aus Cryptophyten. Darüber hinaus besitzen Cryptophyten, je nach Art, mindestens zwei verschiedene α -Untereinheiten (Guard-Friar und MacColl, 1986; Morschel und Wehrmeyer, 1975). Die α -Untereinheiten stellen somit vermutlich eine Cryptophyten-spezifische Protein-Familie dar (Glazer und Wedemayer, 1995), was durch die Lokalisation der korrespondierenden Gene im Nukleus unterstützt wird, während die β -Untereinheiten immer in der Plastide codiert werden (Douglas, 1992; Jenkins *et al.*, 1990).

Die Unterschiede der Untereinheiten manifestieren sich auch in der Tertiärstruktur der Phycobiliproteine. Diese assemblieren nicht zu den aus Rotalgen und Cyanobakterien bekannten Trimer bzw. Hexameren Strukturen, sondern bilden Dimere $\alpha_1\alpha_2(\beta)_2$ (MacColl *et al.*, 1973). Neben der im Vergleich zu Cyanobakterien und Rotalgen ungewöhnlichen Lokalisation im Thylakoidlumen ist auch die für eine effiziente Energieweiterleitung erforderliche Anordnung der Phycobiliproteine noch nicht geklärt. Linker Proteine, welche einerseits für strukturelle Stabilität, andererseits für einen effizienten Energietransfer in Richtung der Photosysteme zuständig sein könnten, fehlen in Cryptophyten. Ebenso die aus Rotalgen bekannten γ -Untereinheiten des Phycoerythrins, die auch Linker Eigenschaften besitzen (MacColl und Guard-Friar, 1987).

1.5 Aufgabenstellung

Das Nukleomorph Genom der Cryptomonade *Guillardia theta* besteht aus drei linearen Chromosomen, welche 464 putativ Protein-codierende Gene tragen. Neben 245 Orfs bekannter Funktion, 19 davon sind vermutlich in der Plastide lokalisiert, befinden sich darunter auch 219 Orfs unbekannter Funktion. 11 davon zeigen Homologien mit cyanobakteriellen Proteinen. Die Aufklärung der Funktion dieser Gene ermöglicht einerseits Rückschlüsse auf die Prozesse während der sekundären Endosymbiose, andererseits dient sie dem Verständnis der Funktionsweise von Plastiden bzw. Cyanobakterien.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des auf Chromosom 1 des Nukleomorphs codierten *orf222*. Homologe Proteine dieses Orfs kommen hauptsächlich in Phycobiliproteinhaltigen Organismen vor, aber auch in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*.

Aufgrund der besseren genetischen Manipulierbarkeit von Cyanobakterien sollte eine *knock-out* Mutante des homologen Gens von *orf222* in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *slr1649*, generiert und mit molekularbiologischen bzw. biochemischen Methoden analysiert werden. Ein bereits vorhandener Antikörper gegen das Slr1649 Protein sollte für immunologische Assays, wie *in-situ* Lokalisation oder Western-Blot Analysen, eingesetzt werden.

Zur Herstellung dieses Antikörpers wurde ein volle Länge Slr1649-GST Fusionsprotein verwendet. Dieses sollte im Rahmen dieser Arbeit in *E.coli* Zellen überexprimiert und anschließend für GST Pull-down Assays benutzt werden, um mögliche Interaktionspartner des Orf222 Homologen Slr1649 zu detektieren. Putativ positive Kandidaten sollten dann mit einem *Yeast-Two Hybrid* Assay verifiziert werden. Weitere experimentelle Ansätze sollten nach Auswertung des Phänotyps der *knock-out* Zellen entwickelt und durchgeführt werden.

2 ERGEBNISSE

2.1 Das Slr1649 Protein von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Vergleichende Analysen bezüglich der Aminosäuresequenz des Slr1649 zeigen, dass Homologe fast ausschließlich in photosynthetisch aktiven Organismen vorkommen (Tab. 2-1). Das Vorhandensein von Phycobiliproteinen scheint dabei eine Rolle zu spielen. Homologe finden sich ebenfalls in höheren Eukaryoten, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*), die keine Phycobiliproteine besitzen. Interessanterweise ist auch auf dem Genom des Bakteriophagen S-PM2, welcher Cyanobakterien als Wirt benutzt, ein homologes Gen codiert (Mann *et al.*, 2005). Des Weiteren befinden sich auch Proteine der CpeT-Familie (*Cyano-phycoerythrin operon protein T*) unter den Homologen. Allen Homologen ist eine DUF1001 Domäne (*domain of unknown function*) gemeinsam (Abb. 2-1). Homologe in eukaryoten Organismen, wie z.B. *Cyanidioschyzon merolae* (*Cyanidioschyzon*) CMK263C, besitzen eine N-terminale Extension, welche als putatives Transitpeptid vorhergesagt wird (Abb. 2-1). Im Falle des Crumpled Leaf Proteins aus *A.thaliana* ist bereits eine Plastidenlokalisation nachgewiesen worden (Asano *et al.*, 2004).

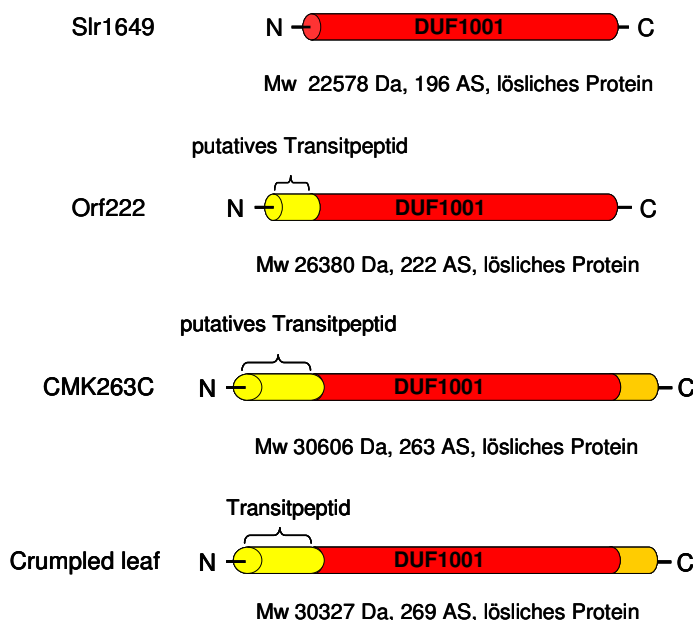


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des Slr1649 Proteins aus *Synechocystis* und homologer Proteine in eukaryoten Organismen. Orf222 aus *G.theta*, CMK263C aus *Cyanidioschyzon* und Crumpled leaf aus *A.thaliana*. Die DUF1001 Domäne (rot) erstreckt sich im Falle von Slr1649 über das gesamte Protein. In Gelb das vorhergesagte Transitpeptid von Orf222, sowie CMK263C. Für das Crumpled leaf Protein konnte durch Asano *et al.* bereits eine Plastidenlokalisation gezeigt werden (Asano *et al.*, 2004). In *Cyanidioschyzon* und *A.thaliana* erstreckt sich die DUF1001 Domäne nicht über das gesamte Protein (in Orange gekennzeichnet). Die angegebenen molekularen Massen (Mw) gehen auf Vorhersagen des Programms Peptide Mass, die Löslichkeits Vorhersagen auf die Programme TMHMM, bzw. Sosui zurück (Kap. 5.1.12.6).

Weitere Analysen zeigen, dass die Anzahl von Homologen in einem Organismus bzw. einer Organismengruppe unterschiedlich ist (Tab. 2-1), was vor allem auf die Gruppe der Cyanobakterien zutrifft. Dies korreliert in den meisten Fällen mit der Anwesenheit verschiedener Phycobiliprotein-Klassen (ausgenommen Allophycocyanin). Organismen mit nur einer Art von Phycobiliproteinen, z.B. *Synechocystis* und *G. theta*, besitzen nur ein Protein

Organismus		Phycobiliproteins (außen genommen APC)	Homolog zu Slr1649	Länge des Proteins (As)	Expect value
<i>Synechocystis</i>	S. sp. PCC 6803	Phycocyanin	Slr1649	196	0
<i>Crocospaera watsonii</i>	WH 8501	Phycocyanin Phycoerythrin	CwatDRAFT_4238 CwatDRAFT_0664 CwatDRAFT_5720	196 215 149	5e-74 5e-32 7e-14
<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc punctiformes</i> PCC 73102	Phycocyanin Phycoerythrocyanin	Npun02004130 Npun02004123 Npun02007740	197 209 201	6e-70 9e-41 3e-19
	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120		All5339 Alr0647	199 198	2e-67 3e-18
	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413		Ava_2579 Ava_4579	199 198	6e-67 8e-18
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	BP-1	Phycocyanin	Tlr2156	196	4e-67
<i>Synechococcus</i>	S. elongatus PCC6301	Phycocyanin Phycoerythrin	Syc0738_d Syc0764_d	197 197	3e-63 6e-21
	S. sp. WH 8102		SYNW2024 SYNW2003	197 204	6e-27 6e-26
	S. sp. CC9902		Sync9902_1910 Sync9902_1887	200 204	7e-30 2e-23
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	IMS101	Phycocyanin Phycoerythrin	TeryDRAFT_1163 TeryDRAFT_1416	195 209	3e-62 4e-27
<i>Calothrix</i>	<i>Calothrix</i> sp.	Phycocyanin Phycoerythrin	CpeT	207	2e-39
<i>Gloeobacter violaceus</i>	PCC 7421	Phycocyanin Phycoerythrin	Glr1182 Glr1193 Glr1538	202 203 183	2e-38 3e-37 5e-25
<i>Prochlorococcus marinus</i>	MIT 9211	Phycoerythrin	P9211_07167	192	8e-27
	MIT 9313		PMT1678	239	5e-24
	NATL2A		PMN2A_1676	199	4e-21
	CCMP1375		Orf195	195	7e-17
<i>G. theta</i>		Phycoerythrin	Orf222	222	1e-21
<i>Bacteriophage S-PM2</i>	Wirt= <i>Synechococcus</i>		S-PM2p215	175	2e-18
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>			CMK263C	263	1e-28
<i>Arabidopsis thaliana</i>			Crumpled Leaf	269	5e-04

Tab. 2-1: Homologe von Slr1649 in pro- und eukaryoten Organismen. Zusammenfassung der Homologen von Slr1649. Expect values beruhen auf einem NCBI BlastSearch. Expect value in Blau für Proteine der Slr1649-Gruppe, in Rot für Proteine der CpeT-Gruppe und in Schwarz für weitere Homologe in Cyanobakterien bzw. Homologe in Eukaryoten.

welches homolog zu Slr1649 ist (Tab. 2-1). Im Gegensatz zu Organismen mit verschiedenen Phycobiliproteinen, welche in den meisten Fällen zwei bzw. bis zu drei Homologe besitzen.

Darüber hinaus zeigt sich, dass neben der Gruppe der Homologen eukaryoter Herkunft mindestens eine weitere Unterteilung innerhalb der Slr1649 Homologen möglich ist: Zum einen die Slr1649-Gruppe, zum anderen die CpeT-Gruppe (Tab. 2-2). Die CpeT-Gruppe umfasst nur Organismen, welche Phycoerythrin besitzen, wohingegen die Slr1649-Gruppe Organismen mit Phycocyanin beinhaltet. In einigen Organismen treten weitere Homologe auf, die jedoch nicht eindeutig einer Gruppe zugeordnet werden können.

Ein weiterer Unterschied zwischen Slr1649- und CpeT-Gruppe liegt im genetischen Kontext. Hier scheint, obgleich einer vermutlich ähnlichen Funktion, die CpeT-Gruppe einen deutlich konservierteren Genlokus zu besitzen als die Slr1649-Gruppe (Tab. 2-2).

Slr1649-Gruppe		CpeT-Gruppe	
<i>slr1649</i> Homolog	Genomischer Kontext	<i>slr1649</i> Homolog	Genomischer Kontext
<i>slr1649</i>	<i>slr1648/ssr2754/ssr2755/slr1649</i>		
<i>cwatdraft_4238</i>	<i>cwatDRAFT_4238/cwatDRAFT_4297</i>	<i>cwatdraft_0664</i> <i>cwatdraft_5720</i>	<i>cpeA/cwatdraft_0664(cpeT)/cpeY</i> <i>cpeS/cwatdraft_5720(cpeT)/cpeR</i>
<i>npun02004130c</i>	<i>tbrC/npun02004130/npun02004134</i>	<i>npun02004123</i> <i>npun02007740</i>	<i>cpeS/npun02004123(cpeT)/cpeR</i>
<i>all5339</i>		<i>alr0647</i>	-
<i>ava_2579</i>		<i>ava_4579</i>	-
<i>sync0738_d</i>	<i>ruvC/hypothetical protein/sync0738_d</i>	<i>sync0764_d</i>	-
<i>synw2024</i>	<i>rpbB/rpbA/synw2024/phycoyanobilin-lyase</i>	<i>synw2003</i>	<i>cpeS/synw2003(cpeT)/cpeR</i>
<i>sync9902_1910</i>	<i>cpeB/cpeA/sync9902_1910/phycoyanobilin-lyase</i>	<i>sync9902_1887</i>	<i>cpeS/sync9902_1887(cpeT)/cpeR</i>
<i>terydraft_1163</i>	<i>cyp/cyp/tery1163/transposase</i>	<i>terydraft_1416</i>	<i>cpeF/terydraft_1416(cpeT)/cpeZ-</i>
<i>tlr2156</i>	<i>tlr2154/hemD/tlr2156</i>	<i>cpeT</i>	<i>cpeS/cpeT/cpeR</i>
<i>glr1182</i>	<i>apcD/glr1182/cpeB/cpeA</i>	<i>glr1193</i> <i>glr1538</i>	<i>cpeS/glr1193(cpeT)</i>
		<i>p9211_07167</i>	<i>cpeS/p9211_07167(cpeT)</i>
		<i>pmt1678</i>	<i>cpeS/pmt1678(cpeT)</i>
		<i>pmm2a_1676</i>	<i>cpeS/pmm2a_1676(cpeT)</i>
		<i>orf195</i>	<i>cpeS/orf195(cpeT)</i>

Tab. 2-2: Gegenüberstellung des genomischen Kontextes von homologen Genen der *cpeT*- und *slr1649*-Gruppe. Die Zuordnung in die jeweilige Gruppe erfolgte auf der Basis eines Aminosäure Alignments (Tab. 2-1, Abb. 7-2, Abb. 7-3). Keine Angaben in der letzten Spalte bedeuten, dass keine benachbarten Gene in derselben Orientierung gefunden werden konnten. Die Genbezeichnungen beziehen sich auf bereits in Tab. 2-1 erwähnte homologe Proteine des Slr1649 in Cyanobakterien.

Das *cpeT* Gen liegt meistens downstream des *cpeS* Gens und/oder innerhalb eines Phycoerythrin Operons. Diese Abfolge ist auch in der Ordnung Prochlorales beibehalten. Die Gene der Slr1649-Gruppe sind hingegen nur in einzelnen Fällen, z.B. *Synechococcus* sp. CC 9902 innerhalb des Phycocyanin Operons zu finden und auch sonst scheinen bezüglich des genomischen Kontextes keine Übereinstimmungen vorhanden zu sein (Tab. 2-2).

2.2 Knock-out des slr1649

Um mehr über die Funktion des Slr1649 Proteins zu erfahren, wurde ein revers-genetischer Ansatz gewählt. Hierbei konnten mit Hilfe einer Kanamycin Resistenz Kassette in den offenen Leserahmen des *slr1649* Gens *knock-out* Zellen generiert werden. Dies geschieht im Cyanobakterium *Synechocystis* durch homologe Rekombination (Abb. 2-2). Der *slr1649 knock-out* Stamm wurde von Julia Prechtel generiert.

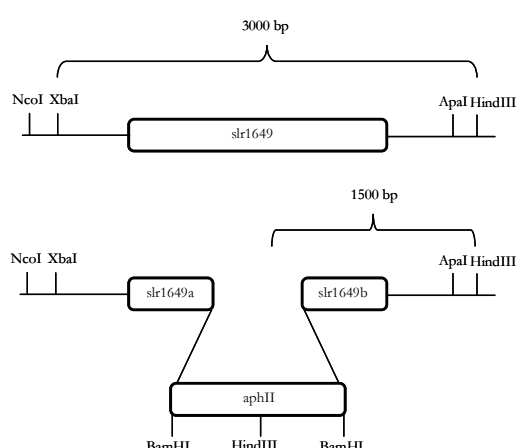


Abb. 2-2: Schema des *knock-out* Konstrukts. Die beiden *slr1649* Abschnitte a und b wurden mit Hilfe zweier Primer-Paare amplifiziert. Durch Schnittstellen in den Primern wurden am 3' Ende des A Fragments und am 5' Ende des B Fragments *Bam*HI Schnittstellen generiert, über die dann die Kanamycinresistenz (*aphII* Gen) in das Konstrukt eingefügt werden konnte. Nach Transformation dieses im pKS-Vektor generierten Konstrukts in *Synechocystis* Wt Zellen konnte auf positive Transformanten selektiert werden

Nach initialer Selektion auf Bg-11 Agar-Platten mit einer Kanamycinkonzentration von 5 µg/ml wurden putativ positive Kolonien in flüssiges Bg-11 Medium überimpft und die Konzentration des Antibiotikums sukzessiv gesteigert. Ab einer Konzentration von 20 µg/ml wurden PCR Analysen als Kontrollexperimente durchgeführt, um den Status des *knock-outs* zu überprüfen (nicht gezeigt). Bei einer Kanamycinkonzentration von 50 µg/µl konnten homogenomisch mutante Zellen (Δ slr1649) etabliert werden. Southern Blot Analysen mit *Hind*III/*Xba*I restringierter genomischer DNA zeigten Banden der erwarteten Größe (Wt = 3000 bp, Δ slr1649 = 1500 bp). Des Weiteren konnte auf RNA Ebene kein *slr1649* Transkript in Δ slr1649 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 2-3), weshalb von einem homogenomischen *knock-out* ausgegangen werden kann.

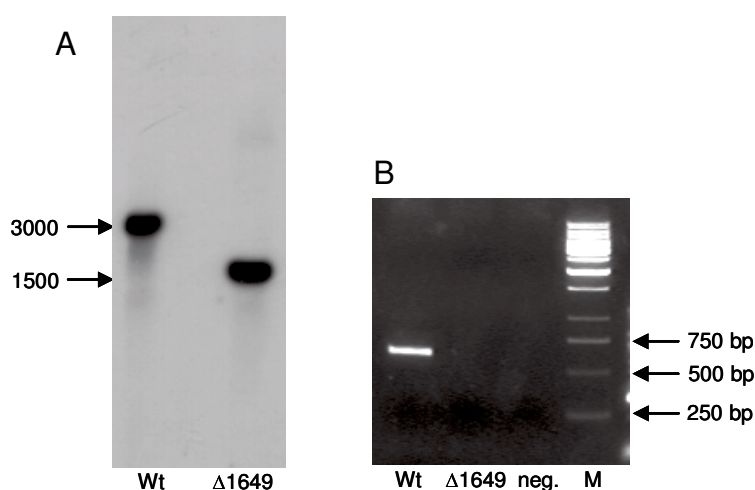


Abb. 2-3: Kontrolle der *slr1649* knock-out Zellen. (A) Für die hier dargestellten Southern-Blot Analyse wurden als Restriktionsenzyme *Hind*III und *Xba*I gewählt (siehe auch Abb. 2-2). Das erhaltene Bandenmuster zeigt sowohl in Wt- als auch in Δ slr1649-Zellen nur eine spezifische Bande. Der Größenunterschied zwischen diesen Banden weist auf einen homogenomischen knock-out hin. Als Sonde wurde ein DIG markiertes *slr1649b* Fragment verwendet (siehe Abb. 2-2). (B) In Reverse-Transkriptions Experimenten konnte nur mit Wt Gesamt-RNA das *slr1649* Transkript nachgewiesen werden. Es wurden jeweils 5 μ g RNA eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 0,8 %igen Agarose-Gel. Neg = negativ Kontrolle, M = 1 Kb Marker.

2.3 Immunologische Experimente

Antikörper stellen ein vielfältiges Werkzeug in der Analyse von Proteinen unbekannter Funktion dar. Aus diesem Grund wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das Slr1649-Protein generiert (Precht mündl. Korrespondenz). Durch Western-Blot Analysen sollte einerseits die Spezifität dieses Antikörpers untersucht und andererseits die Lokalisierung des Slr1649 Proteins, in der löslichen Fraktion oder Membranfraktion, gezeigt werden. Hierzu wurde Gesamtproteinextrakt aus *Synechocystis* Wt Zellen durch Ultrazentrifugation subfraktioniert (Kap. 5.2.5.1). Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde

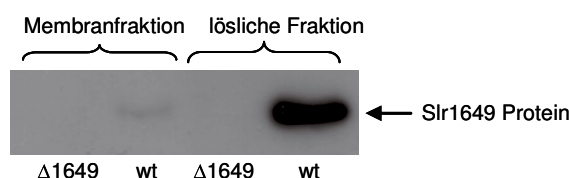


Abb. 2-4: Western-Blot Analyse mit subfraktioniertem *Synechocystis* Gesamtprotein Extrakt aus Wt bzw. Δ slr1649 Zellen. Nach Detektion mit α -1649 Antikörper ($E_k = 1:1000$) und α -rabbit Sekundärantikörper ($E_k = 1:50\,000$) ist in der Membranfraktion ein schwaches Signal im Größenbereich des Slr1649 Protein in der Wt Spur zu sehen. Die lösliche Fraktion zeigt ein deutlich stärkeres Signal in der Wt Spur. In Δ slr1649 Zellen ist weder in der Membranfraktion, noch in der löslichen Fraktion ein Signal zu sehen. Die Proteine wurden auf einem 12,5 %igen SDS Gel aufgetrennt

anschließend mit Hilfe des α -1649 Antikörpers versucht, das Slr1649-Protein nachzuweisen. Wie in Abb. 2-4 zu sehen, ist sowohl im löslichen Proteinextrakt wie auch in der Membranfraktion aus Δ slr1649 Zellen kein Signal in der entsprechenden Größe detektierbar gewesen. Demgegenüber zeigte das Wt Extrakt ein deutliches Signal, vor allem in der löslichen Fraktion. Dies zeigt einerseits, dass kein Slr1649 Protein in den knock-out Zellen vorhanden ist. Andererseits bestätigt dieses Experiment *in-silico* Vorhersagen, das es sich im Falle von Slr1649 um ein lösliches Protein handelt.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, mit Hilfe des in Abb. 2-4 verwendeten Antikörpers das Slr1649 Protein auf elektronenmikroskopischen Ultradünnschnitten von *Synechocystis* Wt Zellen zu lokalisieren. Wie in Abb. 2-5 gut zu erkennen, sind die mit Gold

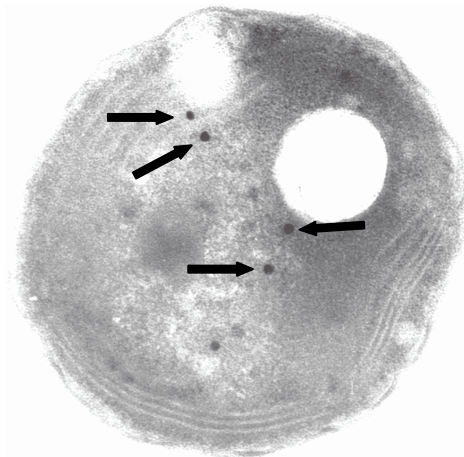


Abb. 2-5: TEM Aufnahme einer mit α -1649 behandelten *Synechocystis* Wt Zelle. Ultradünnschnitte von *Synechocystis* Wt Zellen wurden mit α -slr1649 (Verdünnung 1:800) inkubiert. Nach Detektion mit einem Goldmarkierten α -rabbit Sekundärantikörper erfolgte die Analyse im TEM. Deutlich zu sehen sind die Markierungen im Cytosol der Zelle und die Thylakoidstruktur im Inneren der Zelle Maßstab 1:25 000.

markierten Sekundärantikörper überwiegend im Cytosol zu finden. Dies konnte durch die Analyse weiterer markierter Zellen bestätigt werden. Dabei scheinen sie zufällig verteilt, da keine Korrelation zwischen Markierung und einer Struktur in den *Synechocystis* Zellen nachgewiesen werden konnte.

2.4 Charakterisierung der Δ slr1649 Zellen

Die generierten *knock-out* Zellen wurden in einem ersten Schritt phänotypisch charakterisiert. Dabei zeigten Vergleiche der Kulturen von Wt und Δ slr1649 einen deutlichen farblichen Unterschied (Abb. 2-6 A). Die mutanten Zellen sind hellgrün, im Vergleich mit Wt Zellen. Dies konnte nicht auf unterschiedliche Zelldichten zurückgeführt werden, da unter Standard-

Bedingungen (siehe auch Kap. 5.2.1.3) über einen Zeitraum von acht Tagen kein Unterschied bezüglich ihrer Wachstumsrate festzustellen war (Abb. 2-6 B).

Aufgrund des unterschiedlichen Phänotyps zwischen Wt und Δ slr1649 Zellen wurde die Absorption der verschiedenen Kulturen bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen (Abb. 2-7 A). Verglichen mit dem Wt ergab sich hierbei ein signifikanter Rückgang der Absorption in den mutanten Zellen bei 620 nm, während alle anderen Maxima gleich blieben. Die reduzierte Absorption bei 620 nm ließ eine Veränderung im Phycocyanin-Gehalt der Δ slr1649 Zellen vermuten, da 620 nm die maximale Absorption des in *Synechocystis* enthaltenen Phycocyanin ist.

Weitere spektroskopische Analysen bezüglich des Phycocyanin-, wie auch des Chlorophyll-Gehalts zeigten eine Reduktion des Phycocyanin-Gehalts in Δ slr1649 Zellen um ca. 60 % im Vergleich mit Wt Zellen (Abb. 2-7 B). Der Chlorophyll-Gehalt hingegen blieb in etwa gleich (Abb. 2-7 C).

Da Phycocyanin in Cyanobakterien Teil der Phycobilisomen ist, konzentrierten sich die folgenden Experimente auf die Analyse dieser Multiproteinkomplexe.

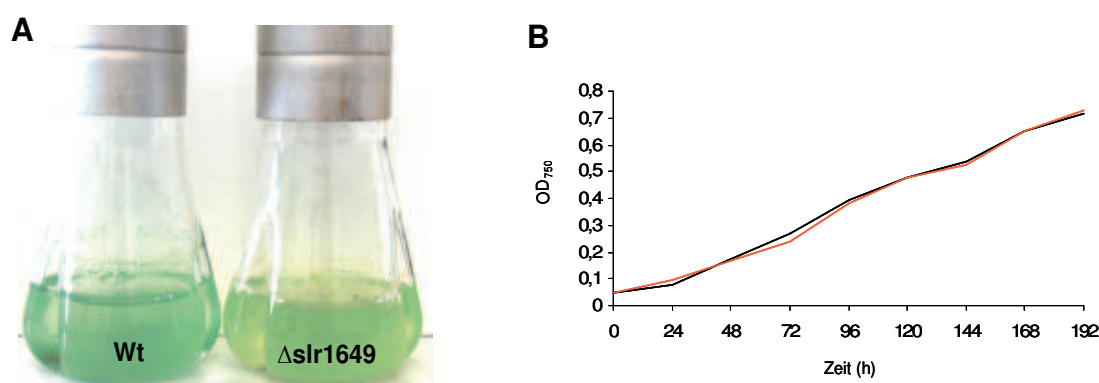


Abb. 2-6: Phänotypische Eigenschaften der Δ slr1649 Zellen. (A) Kultur von Wt und Δ slr1649 Zellen unter Standard Wachstumsbedingungen. Beide Kulturen haben die gleiche Zelldichte (OD₇₅₀ 0,5). Trotzdem ist deutlich ein farblicher Unterschied zu erkennen. Die Δ slr1649 Zellen erscheinen hellgrün, während die Wt Zellen dunkelgrün sind. (B) Unter Standard-Wachstumsbedingungen über 8 Tage war kein Unterschied im Wachstum zwischen WT (rote Linie) und Δ 1649 (schwarze Linie) Zellen zu ermitteln.

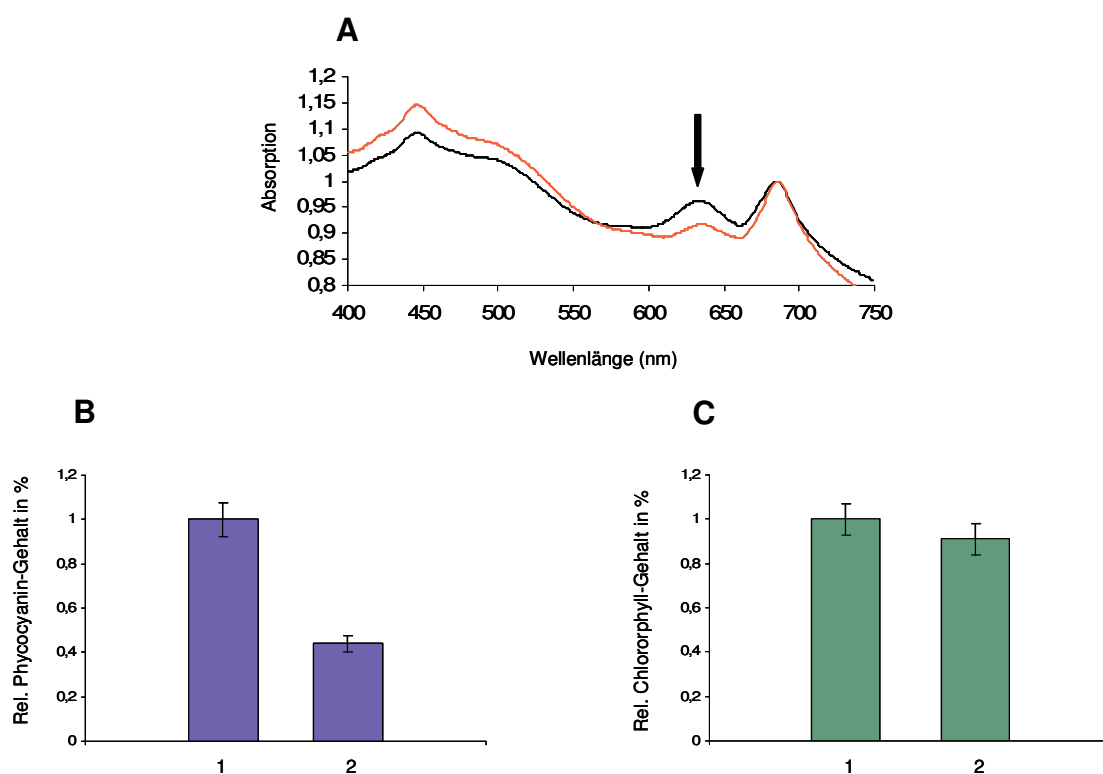


Abb. 2-7: Spektroskopische Analyse der Δ slr1649 Zellen. (A) Absorptionsspektren von Wt (schwarze Linie) und Δ slr1649 (rote Linie) Zellen. Bei etwa 620 nm ist eine deutliche Reduktion des Δ slr1649 Spektrums zu erkennen (Pfeil). Die Spektren wurden bei 680 nm, dem zweiten Chlorophyll Maximum, normalisiert. (B) Vergleichende Analysen des Phycocyanin-Gehalts (blaue Balken) in Wt (1) und Δ slr1649 (2) Zellen zeigten eine Reduktion um 60 % in der Mutante (Kap. 5.2.9.2). (C) Der Chlorophyll-Gehalt in beiden Kulturen ist ungefähr gleich (grüne Balken, Kap. 5.2.9.1).

Die Berechnungen sowohl des Phycocyanin- wie auch des Chlorophyll-Gehalts basieren der Absorption bei bestimmten Wellenlängen. Veränderte Eigenschaften der Phycobiline oder des Chlorophylls können somit zu falschen Werten führen.

2.5 Analyse der Phycobilisomen

2.5.1 Isolation intakter Phycobilisomen

Trotz ihrer Größe ist es möglich intakte Phycobilisomen, d.h. Rods verbunden mit Core Strukturen, aus Zellen zu isolieren. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Phycobilisomen zu Nutze, in Puffern höherer Molarität nicht zu dissoziieren. In *Synechocystis* ist Phycocyanin neben Allophycocyanin das einzige Phycobiliprotein in den Phycobilisomen. Aufgrund der Ergebnisse aus Kap. 2.4 wurden intakte Phycobilisomen aus Wt und Δ slr1649 Zellen isoliert und auf einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten geladen (10 % - 60 % in 0,75 M KPP

pH 7,0, Kap. 5.2.6). Nach 15 Std Zentrifugation wurde eine tiefblaue Bande sichtbar, welche die intakten Phycobilisomen beinhaltet (Abb. 2-8). Die Migrationsweite der Δ slr1649 Phycobilisomen war dabei geringer als die des Wt. Des Weiteren waren die Phycobilisomen-Banden der Δ slr1649 Probe im Vergleich zum Wt weniger scharf abgegrenzt. Hier ist deutlich eine bläuliche Verfärbung des Bereichs oberhalb und unterhalb der prominenten Bande zu erkennen. Darüber hinaus scheinen in den dem Gradienten aufliegenden Zelltrümmern weitere Phycobiliproteine lokalisiert zu sein.

Die intakten Phycobilisomen, welche sich in der blauen Bande befanden, wurden abgenommen und ihre Absorption bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Verschiebung des Absorptionsmaximums der Δ slr1649 Phycobilisomen in den rötlichen Bereich (650 nm), im Vergleich mit dem Maximum des Wt bei 620 nm. Dieser Absorptions-Peak entspricht dem Maximum des Phycocyanin, während der Peak bei 650 nm dem Absorptionsmaximum von Allophycocyanin entspricht. Letzteres wird im Wt Spektrum vom Phycocyaninmaximum überlagert, ist aber noch an einer leichten Schulter zu erkennen (Pfeil, Abb. 2-8 B).

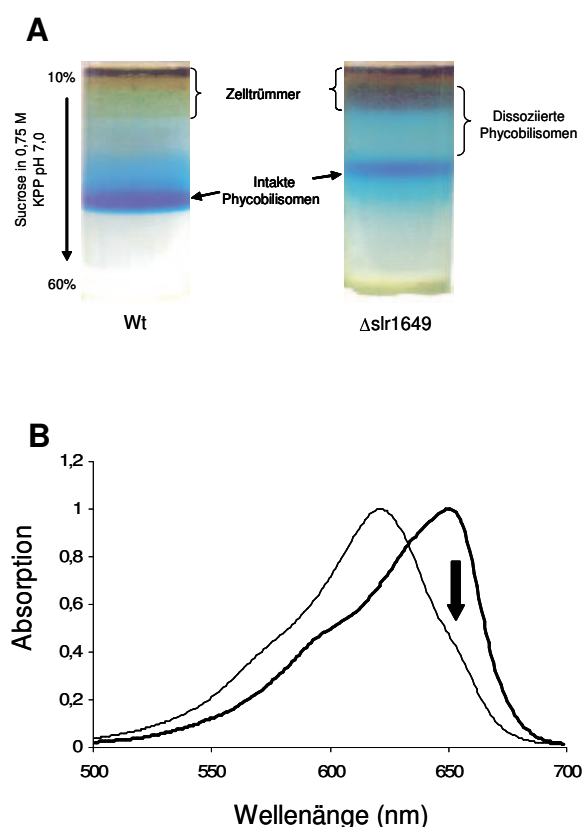


Abb. 2-8: Isolation und spektroskopische Analyse intakter Phycobilisomen. (A) *Synechocystis* Protein Extrakte wurden gemäß Kap. 5.2.6 behandelt. Sowohl in der Wt wie auch in der Δ 1649 Probe ist eine prominente blaue Bande zu erkennen, welche unterschiedlich weit in den Gradienten eingewandert ist. Dem Gradienten liegen Membranbestandteile, bzw. Zelltrümmer auf.

(B) Fluoreszenz-Spektroskopische Analyse der isolierten Phycobilisomen bei Raumtemperatur. Die beiden Kurven zeigen unterschiedliche Absorptionsmaxima. Phycobilisomen aus Δ slr1649 Zellen (dicke Linie) besitzen ein Maximum bei 650 nm, während Wt Phycobilisomen (dünne Linie) ein Maximum bei 620 nm haben. Der Pfeil deutet auf eine leichte Schulter im Wt Spektrum die die Absorption des Allophycocyanin darstellt. Das Wt Spektrum wurde bei 620 nm und das Δ slr1649 Spektrum bei 650 nm normalisiert, was den jeweiligen Maxima entsprach. Dieses Ergebnis konnte durch mehrere unabhängige Messungen und Isolationen bestätigt werden.

2.5.2 Gelelektrophoretische Analyse der Phycobilisomen

Aufgrund der bisherigen Experimente lag die Annahme einer Veränderung der Phycobiliprotein-Zusammensetzung in den Phycobilisomen nahe. Genaueren Aufschluss darüber sollten SDS-PAGE Analysen der isolierten Phycobilisomen liefern.

Wie in Abb. 2-8 zu sehen, unterscheiden sich die isolierten Phycobilisomen in ihrer Proteinzusammensetzung. Die hier sichtbaren Banden wurden durch MALDI-TOF Analysen identifiziert. Verglichen mit dem Wt (Spur 1) fehlen den Δ slr1649 Phycobilisomen zwei strukturelle Bestandteile der Rods, die Rod Linker CpcC2 und CpcD. Des Weiteren ist das FNR Protein (PetH) in der Menge reduziert. Die Untereinheiten der Phycobiliproteine Allophycocyanin und Phycocyanin konnten unter den hier gewählten Bedingungen nicht ausreichend aufgetrennt werden. Trotzdem lässt sich eine signifikante Veränderung mindestens einer Komponente erkennen.

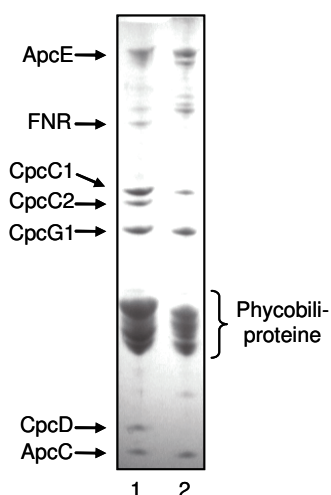


Abb. 2-9: SDS-PAGE Analyse der isolierten Phycobilisomen. Die in Kap. 2.5.1 isolierten Phycobilisomen wurden auf einem 12,5 %igen SDS Gel aufgetrennt (1 = Wt, 2 = Δ slr1649). Die Proteinmenge in jeder Spur beträgt 30 μ g. Alle sichtbaren Banden wurden durch MALDI-TOF Analyse identifiziert. Jene Banden, welche Komponenten der Phycobilisomen darstellen, sind mit Namen versehen. Das FNR Protein ist hier in der Δ slr1649 Probe nicht sichtbar, was an der gewählten Abbildung liegt. Dieses Protein konnte aber in wiederholten Phycobilisomen-Isolationen in geringer Menge, verglichen mit dem Wt, nachgewiesen werden.

Um die betroffene Untereinheit näher bestimmen zu können, wurden SDS Gradientengele verwendet (10-20 %). Dadurch ergab sich insbesondere im Bereich der Phycobiliprotein-Untereinheiten eine bessere Auftrennung. In anschließenden MALDI-TOF Analysen konnte gezeigt werden, dass die Phycocyanin β -Untereinheit in ihrer Masse reduziert ist (Abb. 2-9). Die Untereinheiten der anderen Phycobiliproteinen erscheinen demgegenüber unverändert. Bevor die SDS-Gele in Coomassie gefärbt wurden, erfolgte eine Behandlung in 200 mM ZnSO_4 -Lösung. Durch die darin enthaltenen Zn^{2+} Ionen lassen sich Proteine mit Bilin-Gruppen unter UV-Licht sichtbar machen, während Proteine ohne Bilin-Gruppen nicht zu sehen sind. In Abb. 2-10 ist die Färbung der Phycobiliproteine neben der Coomassie-Färbung

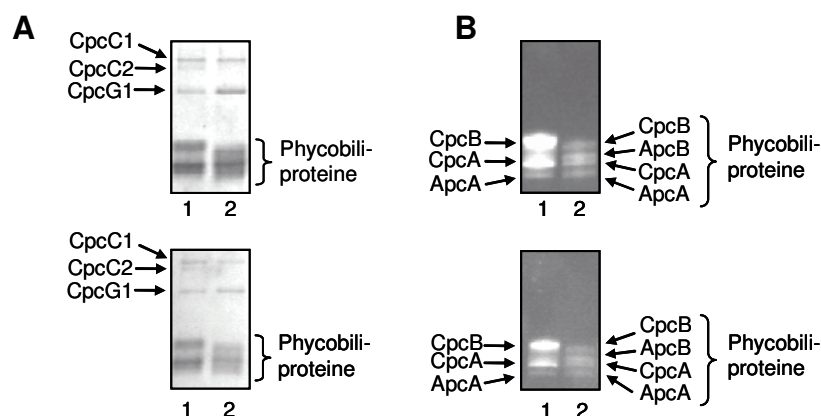


Abb. 2-10: Auftrennung der Phycobilisomen Isolationen auf SDS-Gradienten Gelen (10 %-20 %). (A) Coomassie Färbung der SDS-Gele (1 = Wt, 2 = Δ slr1649). Beide Abbildungen unterscheiden sich lediglich in der Menge der aufgetragenen Proteinmenge (oben 30 μ g, unten 15 μ g). Es ist deutlich die geringere Masse der Phycocyanin β -Untereinheit zu erkennen. In diesen Bildausschnitten sind zusätzlich noch die Linker Proteine CpcC1, CpcC2 und CpcG1 zu erkennen.

(B) ZnSO_4 -Färbung der SDS-Gele aus (A), (1 = Wt, 2 = Δ slr1649). Wie in (A) unterscheiden sich beide Abbildungen nur durch die Menge an aufgetragener Proteinmenge (oben 30 μ g, unten 15 μ g). Nur die Banden der Phycobiliproteine fluoreszieren. Die Banden von CpcB und CpcA im Wt fluoreszieren intensiver als die der Δ slr1649 Zellen, obwohl gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wie auch an der Fluoreszenz der ApcA-Bande in beiden Spuren zu erkennen ist.

zu sehen. Hier ist deutlich zu erkennen, dass nur die Bilin-tragenden Proteine fluoreszieren, während andere, wie z.B. die Linker Proteine CpcC1 und CpcG1, nur in der Coomassie-Färbung zu sehen sind. Auffällig ist der Fluoreszenzunterschied zwischen CpcA und CpcB aus Wt und Δ slr1649 Zellen. Diese Differenz ist nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen wie die Coomassie-Färbung und die Fluoreszenz von ApcA zeigen (Abb. 2-10).

2.5.3 Proteolytische Behandlung der Phycobilisomen

Basierend auf den Ergebnissen aus Kap. 2.5.2 und Kap. 2.5.4 wurde in einem nächsten Schritt eine genauere Charakterisierung der Phycocyanin β -Untereinheit durchgeführt. Da der Größenunterschied zwischen der β -Untereinheit in Wt und Δ slr1649 nicht sehr groß ist, lag es auch im Bereich des Möglichen, dass eine an das Protein gekoppelte chromophore Gruppe betroffen war. In einem ersten Ansatz wurden isolierte Phycobiliproteine mit Ameisensäure restringiert und anschließend mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein chromophorer Gruppen untersucht. Dabei ist anzumerken, dass von allen Phycobiliprotein-Untereinheiten nur die Phycocyanin β -Untereinheit eine Schnittstelle für Ameisensäure an Position 144 besitzt (Abb. 2-11). Die aus dieser Restriktion resultierenden Fragmente mit jeweils einer

chromophoren Gruppe sind 2,8 kDa bzw. 15,4 kDa groß (Abb. 2-11, Tab. 2-3). Alle anderen Phycobiliproteine besitzen keine entsprechende Schnittstelle (Tab. 2-3). Nach der Restriktion und Auftrennung der Proteine auf einem SDS-Gel wurden die Bilin-tragenden proteolytischen Fragmente durch Inkubation mit ZnSO_4 -Lösung sichtbar gemacht (siehe auch Kap. 2.5.2).

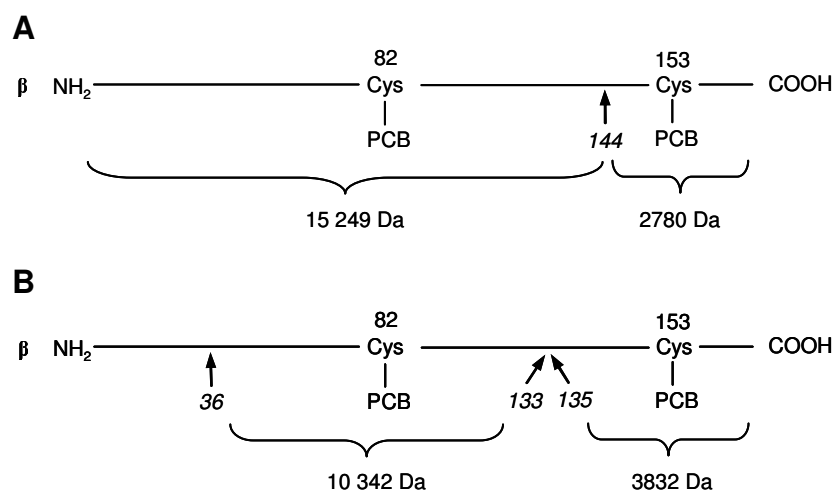


Abb. 2-11: Schematische Darstellung der Phycocyanin β -Untereinheit mit vorhergesagten Schnittstellen. Unterhalb der Klammern befinden sich die vorhergesagten Massen der proteolytischen Fragmente mit chromophorer Gruppe (A) CpcB besitzt als einziges Phycobiliprotein eine putative Ameisensäure Schnittstelle (Position 144). Die beiden entstehenden proteolytischen Fragmente wären 15 249, bzw. 2780 Da groß. Beide besitzen eine chromophore Gruppe, weshalb sie nach Inkubation in ZnSO_4 -Lösung unter UV fluoreszieren sollten. (B) CpcB besitzt drei putative Schnittstellen der Endoproteinase LysC. Die beiden Bilin-tragenden proteolytischen Fragmente wären 10 342 Da bzw. 3832 Da groß.

Wie in Abb. 2-12 A zu sehen, treffen die *in-silico* vorhergesagten Größen zu. Es ist deutlich zu sehen, dass im Unterschied zum Wt in der Spur mit proteolytisch behandelten Phycobilisomen aus $\Delta\text{slr1649}$ Zellen das 2,8 kDa-Fragment nicht detektierbar ist (Abb. 2-12 A, rote Umrandung). Dies würde einen Verlust der chromophoren Gruppe an Position Cys β 155 bedeuten (Tab. 2-3). Deutlich an der Fluoreszenz im Bereich von 17 kDa zu erkennen sind die anderen Phycobiliprotein-Untereinheiten. Unmittelbar darunter bei 15 kDa (Pfeil), ist das zweite proteolytische Fragment mit der chromophoren Gruppe an Cys84 zu erkennen. Dieses ist in beiden Spuren vorhanden, was bedeutet, dass die chromophore Gruppe an Position Cys84 auch in der Phycocyanin β -Untereinheit der Mutante vorhanden ist.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden Phycobilisomen alternativ zur Ameisensäure mit der Endoproteinase LysC verdaut, welche spezifisch das Motiv Lys-|-Xaa schneidet. Die Phycocyanin β -Untereinheit besitzt mehrere vorhergesagte Schnittstellen für LysC (Tab. 2-3).

	Ameisensäure	Endoproteinase LysC		Ameisensäure	Endoproteinase LysC
CpcB	15364 Da (Cys84) 2780 Da (Cys155)	10342 Da (Cys84) 3832 Da 3719 Da (Cys155) 278 Da	ApcB	Keine Schnittstelle	6271 Da (Cys81) 2581 Da 2219 Da 1760 Da 1549 Da 1217 Da 983 Da 516 Da
CpcA	Keine Schnittstelle	8027 Da (Cys84) 2618 Da 2580 Da 2317 Da 1062 Da 677 Da	ApcA	Keine Schnittstelle	8022 Da (Cys81) 2617 Da 2580 Da 2317 Da 1062 Da 678 Da

Tab. 2-3: *In-silico* Vorhersage der proteolytischen Fragmente aller Phycobiliproteine in *Synechocystis* nach LysC-Restriktion bzw. Ameisensäure Behandlung. Fragmente, die eine chromophore Gruppe tragen, sind in Fett hervorgehoben (die Position des entsprechenden Cysteins in Klammern dahinter). Die Vorhersagen beruhen auf den Programmen PeptideMass und PeptideCutter (Kap. 5.1.12.6).

Darüber hinaus besitzen auch alle anderen Phycobiliprotein-Untereinheiten entsprechende Schnittstellen (Tab. 2-3).

Für die Phycocyanin β -Untereinheit wurden die chromophoren Gruppen an proteolytischen Fragmenten mit den Massen 3,7 kDa, sowie 10 kDa erwartet, wobei sich die chromophore Gruppe an Position Cys155 am 3,7 kDa Fragment befindet (Abb. 2-11, Tab. 2-3). Wie in Abb. 2-12 B zu sehen, konnten mehrere fluoreszierende Banden detektiert werden. Alle

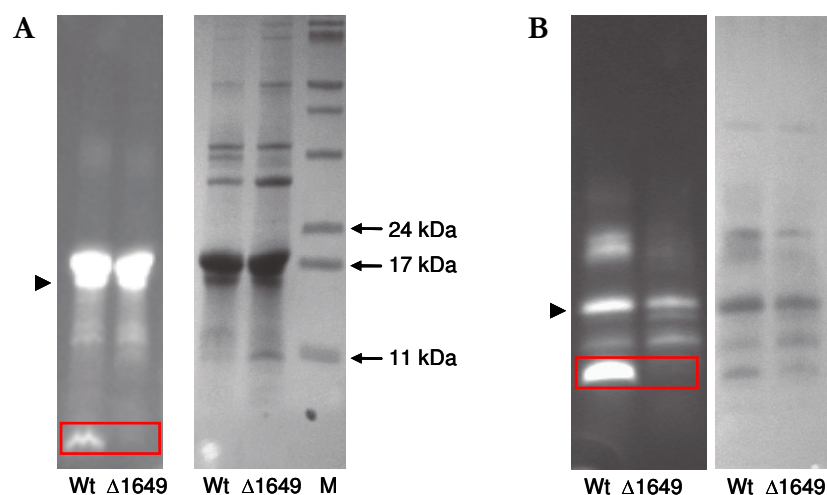


Abb. 2-12: Proteolytische Behandlung der Phycobilisomen. (A) Proteolytische Behandlung mit 75 % (v/v) Ameisensäure und nach Tricine SDS-PAGE kurze Inkubation in 200 mM ZnSO_4 -Lösung (links). Die erwartete Bande bei 15 kDa (Pfeil), läuft unmittelbar unter den nicht restringierten Phycobiliproteinen bei 17 kDa. In der Wt Spur ist im Bereich um 3 kDa ein deutliches Signal zu sehen (rote Umrandung), welches in der $\Delta\text{slr1649}$ Spur fehlt. (B) Analog dem Experiment in A, hier jedoch mit Endoproteinase LysC. Die erwarteten Produkte sind ebenfalls mit Pfeil, bzw. roter Umrandung markiert.

Fluoreszenz Signale korrelieren mit einer Protein Bande, wie im Coomassie-gefärbten Gel zu sehen. Deutlich zu erkennen ist die Abwesenheit eines Signals in der Δ slr1649 Spur bei ca. 4 kDa im ZnSO_4 behandelten Gel (Abb. 2-12 B, rote Umrandung). Im Gegensatz dazu ist in der Wt Spur ein starkes Signal bei 4 kDa sichtbar. Die Coomassie-Färbung des Gels zeigt, dass ähnlich dem Wt auch in der Δ slr1649 Spur eine Proteinbande existiert. Da diese Bande nicht fluoresziert, jedoch die entsprechende Bande im Wt diese Eigenschaft besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass die chromophore Gruppe an diesem proteolytischen Fragment fehlt. Somit konnte das Ergebnis aus den Experimenten mit Ameisensäure bestätigt werden. Bei 10 kDa (Abb. 2-12 B, Pfeil) ist das zweite proteolytische Fragment des CpcB Proteins mit der chromophoren Gruppe an Cys84 zu sehen. Die Fluoreszenz bei 8 kDa geht auf die Phycocyanobilin-tragenden proteolytischen Fragmente der Proteine ApcA und CpcA zurück. Beide besitzen ein ähnliches Restriktionsmuster für LysC, weshalb die Chromophor tragenden Peptide ähnliche Massen besitzen (Tab. 2-3). Bei 17 kDa sind von der Protease nicht gespaltene Phycobiliprotein-Untereinheiten sichtbar.

2.5.4 Transkriptionsanalysen

Neben der reduzierten Masse der Phycocyanin β -Untereinheit, welche auf das Fehlen eines Phycocyanobilin an Position Cys155 der Phycocyanin β -Untereinheit zurückzuführen ist, konnten in SDS-PAGE Analysen die beiden Linker Proteine CpcD und CpcC2 in Phycobilisomen Extrakten aus Δ slr1649 Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 2-9). Um eine mögliche transkriptionelle Ursache dieses Phänotyps zu untersuchen, wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt.

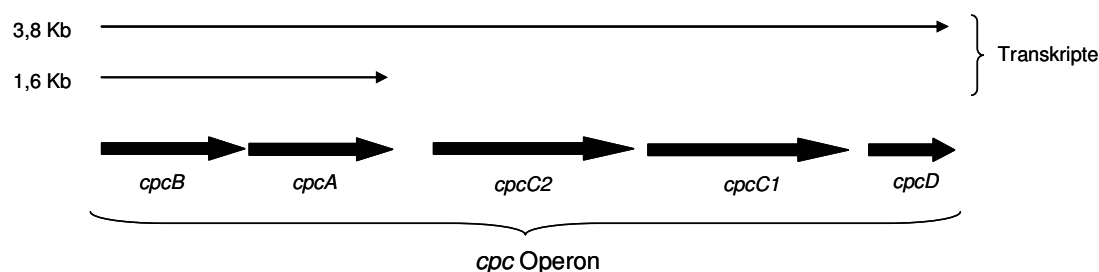


Abb. 2-13: Schematische Darstellung des *cpc* Operons. Anordnung der Gene im *cpc* Operon, bzw. Länge zweier möglicher Transkripte. Das kürzere Transkript mit 1,6 Kb wird stärker transkribiert als das längere mit 3,8 Kb (Ughy und Ajlani, 2004).

In einer Arbeit von Ughy und Ajlani konnte gezeigt werden, dass in *Synechocystis* das *cpc* Operon die Gene *cpcB*, *cpcA*, *cpcC2*, *cpcC1* und *cpcD* umfasst, wobei das 1,6 kb lange *cpcBA* Operon deutlich stärker transkribiert wird als die bis zu 2,2 kb längeren Varianten (Abb. 2-13), (Ughy und Ajlani, 2004).

Das Gelbild in Abb. 2-14 B zeigt, dass das *cpcC2* Transkript aus Δ slr1649 RNA amplifiziert werden konnte. Die unterschiedliche Intensität der Banden lässt hierbei keine quantitativen Rückschlüsse auf die mRNA zu. Die Detektion des CpcC1 Proteins, dessen Gen zwischen *cpcC2* und *cpcD* lokalisiert ist, in SDS-PAGE Analysen isolierter Phycobilisomen (Kap. 2.5.2, Abb. 2-9) deutet auf eine vollständige Transkription des *cpc* Operons in Δ slr1649 Zellen hin. Diese Vermutung wird durch das hier nachgewiesene *cpcC2* Transkript unterstützt.

Northern Blot Analysen mit einer *cpcB* spezifischen Sonde zeigten darüber hinaus, dass zumindest das *cpcBA* Transkript in Wt-ähnlichen Mengen vorliegt (Abb. 2-14). Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete reduzierte Phycocyanin Gehalt (Kap. 2.4) eine post-transkriptionelle Ursache hat.

Diese Experimente zeigen, dass ein direkter Effekt des *knock-outs* auf transkriptioneller Ebene unwahrscheinlich ist.

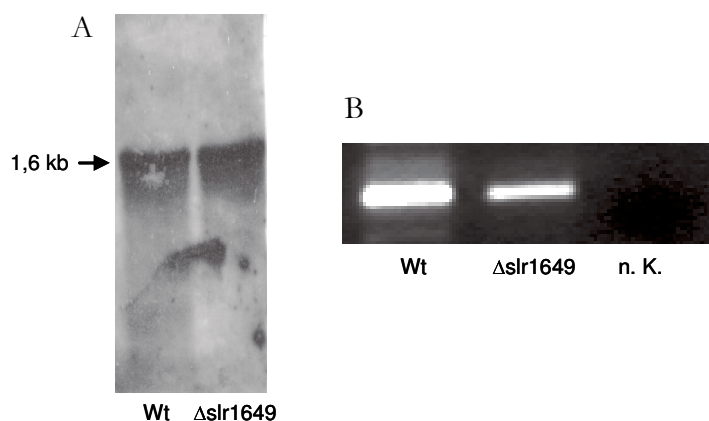


Abb. 2-14: Transkriptionsanalysen. (A) Northern Blot mit DIG markierter *cpcB* Sonde. Beide Spuren enthalten 10 μ g Gesamt RNA aus *Synechocystis* Zellen. Die Signale in beiden Spuren befinden sich bei 1,6 kb, was dem *cpcBA* Transkript entspricht. (B) Reverse Transkription der *cpcC2* mRNA aus *Synechocystis* Gesamt-RNA. n.K. = negativ Kontrolle; d.h. Probe ohne reverse Transkriptase.

2.6 Protein-Protein Interaktions-Assay mit Slr1649

2.6.1 GST-Pull-down Assay

Im Unterschied zum revers genetischen Ansatz wurde parallel auch ein biochemischer zur Analyse des Slr1649 Proteins durchgeführt. Hierbei wurden Pull-down Experimente durchgeführt, um putative Interaktionspartner des Slr1649 GST-Fusionsproteins (**G**lutation-**S**-**T**ransferase) zu isolieren (Kap. 5.2.8.2). Dazu wurde rekombinantes GST-Slr1649-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose Beads gekoppelt und mit Gesamtproteinextrakt aus *Synechocystis* inkubiert (Kap. 5.2.5.1). Als Kontrolle wurde der Pull-down mit dem reinen GST-Anteil durchgeführt. Bereits nach der Inkubation mit *Synechocystis* Proteinextrakt zeigten sich auffällige Unterschiede zwischen Kontrolle und Slr1649-Fusionsprotein. Während die Beads der Kontrolle ihre ursprüngliche weiße Farbe behielten, waren die Beads des Slr1649-Fusionsproteins blau gefärbt (Abb. 2-15).

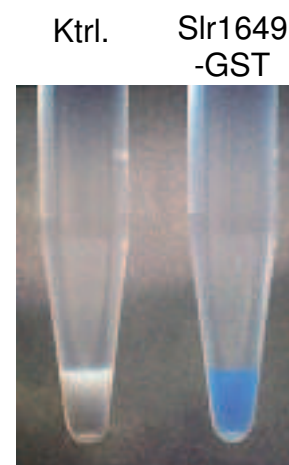


Abb. 2-15: Mit Protein gekoppelte Glutathion Sepharose Beads nach Inkubation mit Gesamt Extrakt. (Ktrl.. = Kontrolle mit GST Protein).

Diese Färbung blieb auch nach weiteren Waschschritten bestehen. Nach der Elution der Proteinanteile von den Beads beider Ansätze wurden diese durch eine SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 2-16). Dabei wurden durch direkten Vergleich mit der GST-Kontrolle Slr1649-spezifische Banden identifiziert. Obwohl die Beads vor der Elution ausgiebig gewaschen wurden, ist der Hintergrund vor allem in der Slr1649-GST Spur, sehr hoch. Trotzdem ist gut zu erkennen, dass die Slr1649-GST Spur einige zusätzliche Protein Banden beinhaltet (Abb. 2-16). Auffällig dabei waren insbesondere die beiden Banden bei 17 kDa (Bande 2 und 3) sowie die Banden bei 26 kDa (Stern), welche auch in der GST Spur vorkommen (Bande 4) und bei ca. 46 kDa (Bande 1). Alle Protein Banden von Interesse wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Julius Nyalwidhe (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lingelbach) eluiert und durch MALDI-TOF Analysen identifiziert.

Sowohl die Bande 4 wie auch die mit einem Stern markierte Bande ist ließen sich als GST identifizieren. Dies war im Falle der Kontrolle zu erwarten. In der Slr1649-GST Spur jedoch sollte kein reines GST auftreten sondern nur das Fusionsprotein aus GST und Slr1649.

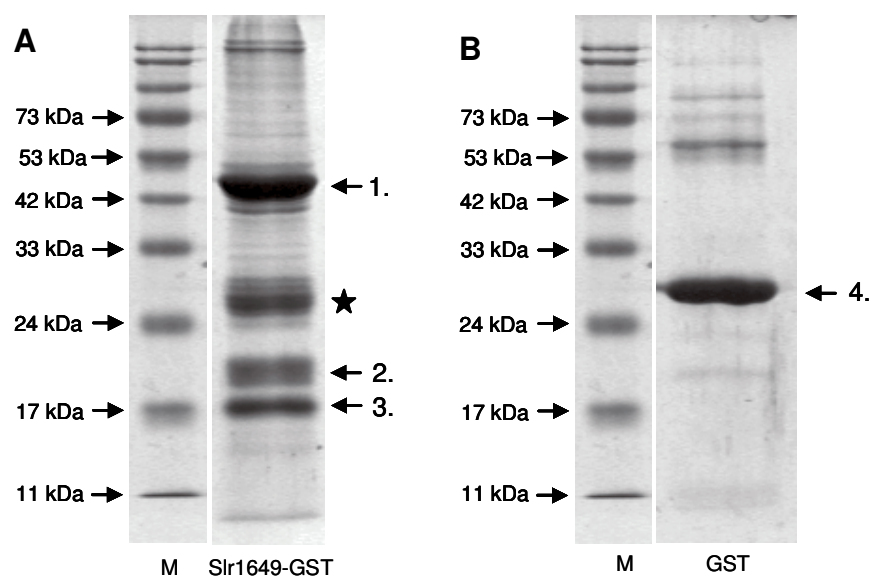


Abb. 2-16: SDS-PAGE des GST *pull-down* Experiments. Die Auftrennung erfolgte auf einem 12,5 % SDS-Gel. (A) Ergebnis des Pull-downs nach SDS-PAGE. Banden, die durch MALDI-TOF identifiziert wurden, sind nummeriert. Trotz häufigen Waschens sind insbesondere in der Slr1649-GST noch viele weitere schwache Banden zu sehen, welche in diesem Experiment als Hintergrund angesehen werden. Die prominente Bande bei 26 kDa (Stern) ist nichtfusioniertes GST. (B) *pull-down* Kontrolle. Es sind deutlich weniger Banden sichtbar. Die prominente Bande Nr. 4 ist nicht fusioniertes GST.

In Experimenten mit anderen GST-Fusionsproteinen konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden und scheint somit System-bedingt.

Bande 1 beinhaltet das Fusionsprotein aus GST und Slr1649, was auch mit der Größe von 48 kDa korreliert. Interessanterweise konnte die Banden 2 und 3 als Phycocyanin α - (Bande 3) und β -Untereinheit identifiziert werden (Tab. 2-4).

Bande	Identifikation	Acess.-Nr.	Mascot Score	Molekulargewicht	Sequence Coverage
1	Slr1649 GST-Fusionsprotein				
2	CpcB	AAA91032	85	18314	56 %
3	CpcA	S75317	74	17690	63 %
4	Gluthation-S-Transferase (GST)				

Tab. 2-4: Ergebnisse der MALDI Analyse. (Acess.-Nr. = NCBI Acession Number, Mascot Score = Signifikanz der Identifizierung, Sequence Coverage = Maß der Sequenzabdeckung).

3 DISKUSSION

Durch sekundäre Endosymbiose entstanden im Laufe der Evolution die Organismengruppen der Chlorarachniophyta, Euglenophyta, Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta und Apicomplexa. Ihnen allen gemeinsam ist der Besitz einer komplexen Plastide, im Falle der Apicomplexa auch Apicoplast genannt. Der Nukleus des Endosymbionten wurde dabei vollständig reduziert. Eine Ausnahme hiervon stellen die Chlorarachniophyten und Cryptophyten dar. In diesen beiden Organismengruppen blieb der Nukleus, der sogenannte Nukleomorph, in stark reduzierter Form im periplastidären Kompartiment zwischen der zweiten und dritten Plastidenmembran erhalten. Das Genom des Nukleomorphs der Cryptomonade *Guillardia theta* wurde 2001 publiziert. Es besteht aus drei linearen Chromosomen, auf denen 464 putativ Protein-codierende Gene lokalisiert sind. Von diesen besitzen 245 Gene Homologien zu Genen bekannter Funktionen in anderen Organismen. Demgegenüber kann 219 Genprodukten keine bekannte Funktion zugeordnet werden, wobei 30 Homologien zu Genen unbekannter Funktion in anderen Organismen zeigen (Douglas *et al.*, 2001).

Auf dem Nukleomorph Genom sind 19 bekannte wahrscheinlich in der Plastide lokalisierte Proteine codiert (Tab. 7-1, Tab. 7-2). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem FtsZ, welches in der Plastidenteilung eine Rolle spielt, die Chaperone Cpn60 und Hcf136, die Translokatoren für das Thylakoidlumen Tha4 und SecE. Lediglich zwei Genprodukte, Rubredoxin und Hlip (*High light induced protein*), sind vermutlich in Prozesse der Photosynthese involviert.

Neben diesen 19 Proteinen bekannter Funktion besitzen weitere 11 Homologien zu cyanobakteriellen Proteinen unbekannter Funktion (Tab. 7-1, Tab. 7-2). Die Charakterisierung dieser Orfs sollte einerseits die Funktion dieser Proteine klären, andererseits Aufschluss über das komplexe Zusammenspiel der vier unterschiedlichen Genome in Organismen mit Nukleomorph geben.

Ziel ist deshalb die Charakterisierung aller Orfs unbekannter Funktion. Im Falle der putativ Plstiden-lokalisierten Orfs wird neben der höheren Pflanze *Arabidopsis thaliana* auf das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modellsystem zurückgegriffen. Dieses System eignet sich für Charakterisierungen plastidär lokalisierter Proteine aufgrund der Möglichkeit, im Genom von *Synechocystis* genetische Manipulationen durchzuführen. Darüber hinaus sind

die Chloroplasten aus dem Vorläufer der heutigen Cyanobakterien hervorgegangen, was Rückschlüsse aus den in Cyanobakterien erworbenen Erkenntnissen auf die Funktion in der Plastide ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit sollte Orf222 aus *G.theta* bearbeitet werden. Das homologe Protein im Modellsystem *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist Slr1649. Die Funktion dieses vor allem in Phycobiliprotein-haltigen Organismen vorkommenden Proteins sollte mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden untersucht werden.

3.1 Slr1649 ist ein lösliches Protein

Analysen mit einem gegen das Slr1649 Protein gerichteten Antikörper unterstützen die *in-silico* Vorhersage, dass es sich bei Slr1649 um ein lösliches Protein handelt (Kap. 2.3). Western-Blots mit fraktionierten Wt Proteinextrakten zeigen, dass das Slr1649 Protein überwiegend in der löslichen Protein Fraktion zu detektieren ist (Abb. 2-4). Das schwächere Signal in der Membranfraktion ist entweder eine Kontamination aus der löslichen Fraktion oder Slr1649 ist teilweise mit Membrankomponenten assoziiert.

Dieses Ergebnis wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen unterstützt. Nach Inkubation mit α -1649 und anschließender Detektion mit Gold markiertem Sekundärantikörper ist eine Häufung der Goldpartikel im Cytosol von *Synechocystis* Wt Zellen zu sehen (Abb. 2-5).

3.2 Charakterisierung der Δ slr1649 Zellen

Synechocystis Zellen mit Insertion einer Kanamycin Resistenzkassette im *slr1649* Gen zeigen einen deutlichen Phänotyp. Kulturen der mutagenisierten Zellen sind hellgrün im Vergleich zum Wt. Unter Standard-Wachstumsbedingungen gibt es keine Unterschiede im Wachstum (Abb. 2-6). Absorptionsspektren von Wt und Δ slr1649 Zellen deuten auf eine Veränderung im Phycobiliprotein-Gehalt hin. Verglichen mit dem Wt zeigen die Δ slr1649 Zellen eine Reduktion des Phycocyanin Maximum bei 620 nm (Abb. 2-7). Messungen des Phycocyanin-Gehalts ergaben eine Abnahme um ca. 60 %, wohingegen der Chlorophyll-Gehalt in der Mutante unverändert blieb (Abb. 2-7).

Dieser Phänotyp (hellgrüne Kultur, reduzierter Phycocyaningehalt) ist unter anderem aus Zellen mit Mutationen in Genen der Phycobiliproteinen, der Linker und der Phycobilin-

Lysen bekannt. Des Weiteren zeigen auch *Synechocystis* Zellen, die in Stickstoff Mangelmedium gehalten werden, diese Merkmale (Collier und Grossman, 1994; Li und Sherman, 2002; Richaud *et al.*, 2001).

Neben ihrer Aufgabe als Lichtsammelkomplex fungieren Phycobilisomen auch als Stickstoffspeicher (Adir, 2005). Zellen, die unter N₂-limitierten Bedingungen gehalten werden, reduzieren die Anzahl der Phycobilisomen bzw. die Länge der Rods. Dies wird durch die *nbl* Genfamilie in einem noch nicht vollständig geklärten Prozeß vermittelt (Li und Sherman, 2002). Es ist im Falle der Δ slr1649 Zellen jedoch unwahrscheinlich, dass die *nbl* Genfamilie die Ursache des reduzierten Phycocyanin-Gehalts ist, da weder Stickstoff limitiert war, noch *in-silico* Analysen Homologien zwischen dem Slr1649 Protein und Mitgliedern der Nbl-Familie aufweisen (Daten nicht gezeigt).

Eine direkte Wirkung des Knock-outs auf strukturelle Komponenten der Phycobilisomen bzw. Komponenten, die an deren Reifung beteiligt sind, erscheint wahrscheinlicher. Untersuchungen von Insertionsmutanten in Genen struktureller Bestandteile der Phycobilisomen zeigen ähnliche Phänotypen wie Δ slr1649 Zellen (Anderson *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 2005; Plank und Anderson, 1995; Plank *et al.*, 1995). Hierbei zeigen sich keine Unterschiede zwischen Mutationen in Phycobiliprotein oder Linker Genen mit Ausnahme der Insertionsmutante in das *pcrD* Gen. Diese zeigt weder im Wachstum noch in den spektroskopischen Eigenschaften Unterschiede zum Wt (Ughy und Ajlani, 2004). Der Phänotyp der Δ slr1649 Zellen deutet somit auf eine Veränderung der Phycobilisomen bzw. der Phycobilisomen-Zusammensetzung hin. Da in *Synechocystis* alle strukturellen Komponenten der Phycobilisomen bekannt sind und Slr1649 nicht dazu gehört, könnte Slr1649 eine Komponente darstellen, welche in der Reifung der Phycobiliproteine eine Rolle spielt.

3.3 Protein-Protein Interaktion des Slr1649

Neben der oben beschriebenen Charakterisierung der Δ slr1649 Zellen wurde in einem parallelen Ansatz versucht mittels GST *pull-down* Assays putative Interaktionspartner des Slr1649 zu identifizieren.

Dabei zeigte sich eine Interaktion des Fusionsproteins mit den Phycocyanin α - und β -Untereinheiten (Kap. 2.6.1). Es ist möglich, dass weitere Faktoren im Protein-Lysat aus *Synechocystis* für die Interaktion benötigt werden, aber in SDS-Gelen nicht sichtbar waren. Dies

würde auch erklären, weshalb in *Yeast-Two-Hybrid* Experimenten durch direktes *maten* von Slr1649 mit den beiden Untereinheiten des Phycocyanins die Interaktion nicht bestätigt werden konnte (nicht gezeigt). Als weitere Faktoren kommen nicht nur weitere Proteine in Frage, sondern auch Energieäquivalente wie ATP oder andere Co-Faktoren.

Obwohl die α - wie auch die β -Untereinheit des Phycocyanins in den Analysen als putative Interaktionspartner identifiziert wurden, kommt unter Berücksichtigung der weiteren Ergebnisse (Kap. 2.5 bzw. Kap. 3.4) vermutlich nur die β -Untereinheit als Bindungspartner in Frage. Die Co-präzipitierte α -Untereinheit geht möglicherweise auf die Bindung von Monomeren bzw. höheren Aggregaten des Phycocyanin durch das Slr1649 Protein zurück (Kap. 1.4.3). In diesen sind α - und β -Untereinheit in äquimolaren Mengen vertreten, weshalb durch die Bindung der β -Untereinheit immer auch eine α -Untereinheit mit gebunden wird.

3.4 Isolation der Phycobilisomen

Um die Phycobilisomen bzw. deren Zusammensetzung zu untersuchen, wurden Phycobilisomen Isolationen aus Δ slr1649 und Wt Zellen in Anlehnung an das Protokoll von Ajlani *et al.* durchgeführt (Kap.5.2.6), (Ajlani *et al.*, 1995). Die intakten Phycobilisomen aus Wt und Δ slr1649 Zellen, welche als blaue Bande im Sucrose-Gradienten sichtbar wurden, unterscheiden sich signifikant in ihrem Migrationsverhalten. Wie in Abb. 2-8 zu sehen, wandern die Phycobilisomen des Wt deutlich weiter in den Gradienten ein als die Phycobilisomen aus Δ slr1649 Zellen. Da die Migrationsweite durch die Masse der Phycobilisomen bestimmt wird, zeigt dieses Experiment, dass Δ slr1649 Phycobilisomen eine, im Vergleich zum Wt, geringere Masse besitzen. Des Weiteren zeigt der Gradient mit Δ slr1649 Phycobilisomen über der prominenten blauen Bande eine blaue Färbung, die im Wt-Gradienten weit weniger ausgeprägt ist (Abb. 2-8). Phycobilisomen Isolationen aus *Synechocystis* Wt Zellen zeigten, dass es sich bei der blauen Färbung über der eigentlichen Phycobilisomen Bande um freies Phycocyanin handelt (Kondo *et al.*, 2005; Reuter *et al.*, 1994; Zolla *et al.*, 2002). Ähnliches konnte auch für *Synechococcus* sp. PCC 6312 Phycobilisomen nachgewiesen werden (Glazer *et al.*, 1979). Neben der Existenz eines freien Phycocyanin Pools in den Zellen wäre es auch möglich, dass das freie Phycocyanin nur aufgrund der Isolationsmethode detektierbar ist. Phycobilisomen können nur in stark ionischen Puffern als vollständiger Proteinkomplex isoliert werden. In schwach ionischen Puffern dissoziieren sie in ihre einzelnen Bestandteile,

Linker und Phycobiliproteine (Glazer, 1988). Die Phycobilisomen Isolation in Kap. 2.5.1 wurden deshalb in 0,75 M KPP durchgeführt, wodurch die Proteinkomplexe erhalten bleiben, wie im Wt Gradienten zu sehen (Abb. 2-8). Ein geringer Anteil freien Phycocyanins ist trotzdem über der prominenten Phycobilisomen Bande nachzuweisen. Die Situation bei den Δ slr1649-Phycobilisomen stellt sich anders dar. Hier ist neben einer nicht wildtypisch migrierten prominenten Bande auch ein signifikant erhöhter Anteil freien Phycocyanins im oberen Teil des Gradienten zu erkennen (Abb. 2-8). Möglicherweise besitzen die Phycobilisomen aus Δ slr1649 Zellen einen größeren Pool freien Phycocyanins bei gleichzeitig in der Masse reduzierten Phycobilisomen. Es wäre jedoch auch hier eine methodische Ursache denkbar, welche die Dissoziation der Phycocyanin Rods begünstigt. Dies könnte ebenfalls die geringere Migrationsweite erklären, da durch dissoziierte Phycocyanin-Komponenten die Phycobilisomen in ihrer molekularen Masse abnehmen würden.

Auffällig ist die breite blaue Färbung des Δ slr1649-Gradienten, welche sich vom oberen Rand bis auf die Höhe der Wt Phycobilisomen zieht (Abb. 2-8). Offensichtlich besitzen Δ slr1649-Phycobilisomen eine größere Massenvarianz, wobei der Hauptteil in der Masse reduziert zu sein scheint. Trotzdem besitzt nur ein geringer Teil der Δ slr1649-Phycobilisomen die Masse der Wt Phycobilisomen, da bei direktem Vergleich der Sucrose-Gradienten auch auf Höhe des Wt im Δ slr1649-Gradient eine blaue Färbung zu erkennen ist.

3.4.1 Spektroskopische Analyse der Phycobilisomen

Absorptionsspektren isolierter Phycobilisomen aus Wt und Δ slr1649 Zellen zeigten unterschiedliche Maxima (Abb. 2-8). Die Wt Phycobilisomen besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 620 nm, dem Maximum des Phycocyanins, wohingegen Δ slr1649-Phycobilisomen ihr Absorptionsmaximum bei 650 nm besitzen, dem Maximum des Allophycocyanins. Insgesamt war die Absorption der Δ slr1649-Phycobilisomen wesentlich geringer als die der Wt Phycobilisomen. Um eine Vergleichbarkeit der beiden Spektren in Abb. 2-8 herzustellen, wurden diese auf das jeweilige Maximum normalisiert. Der stark erhöhte Peak des Allophycocyanins ist demnach nicht auf eine Zunahme dieses Phycobiliproteins zurückzuführen.

Die Verschiebung des Δ slr1649-Spektrums hin zum längerwelligen Maximum des Allophycocyanin und die insgesamt niedrigere Absorption im Vergleich zum Wt ist nur durch eine Abnahme des Phycocyanin-Gehalts innerhalb der Phycobilisomen zu erklären. Das

Allophycocyanin Maximum ist, wie im Wt Spektrum zu sehen, vom Phycocyanin-Maximum verdeckt und nur durch eine leichte Schulter bei 650 nm zu vermuten (Abb. 2-8 Pfeil). In den Δ slr1649 Zellen scheinen die Verhältnisse umgekehrt. Das deutlich prominentere Allophycocyanin-Maximum verdeckt das Phycocyanin-Maximum (Abb. 2-8).

Der durch das Spektrum nachgewiesene stark reduzierte Anteil an Phycocyanin in isolierten Phycobilisomen aus Δ slr1649 Zellen, unterstützt die Vermutung aus Kap. 3.4, dass die verringerte Migrationsweite isolierter Δ slr1649-Phycobilisomen wahrscheinlich auf eine Abnahme der Phycocyanin-Bestandteile in den Rods zurückzuführen ist. Unter Berücksichtigung des Gesamt-Zell-Spektrums aus Abb. 2-7 A ist zu vermuten, dass die Dissoziation der Phycocyanin Rods durch die Präparation begünstigt wurde. Das Spektrum in Abb. 2-7 zeigt einen reduzierten aber sichtbaren Peak bei 620 nm in Wt und Δ slr1649 Zellen. Eine so massive Verschiebung des Absorptionsmaximum in den längerwelligen Bereich, wie bei isolierten Phycobilisomen in Abb. 2-8 zu sehen, wäre auch im Gesamt-Zell-Spektrum detektierbar gewesen. Es ist deshalb wenig wahrscheinlich, dass die Phycobilisomen der Δ slr1649 Zellen *in vivo* strukturell ähnlich reduziert sind wie nach der Präparation über einen Sucrose Gradienten. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Großteil des Phycocyanins in Δ slr1649 Zellen frei vorliegt (siehe auch Kap. 3.4.2.3).

3.4.2 SDS-PAGE Analyse der isolierten Phycobilisomen

Isolierte Phycobilisomen wurden zur detaillierten Analyse der Proteinzusammensetzung gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.5.2). Auffälligstes Merkmal war einerseits das Fehlen der beiden Linker Proteine CpcD und CpcC2 in isolierten Δ slr1649 Phycobilisomen (Abb. 2-9). Andererseits konnte nach optimierter Auftrennung eine in der Masse reduzierte β -Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 2-10). Darüber hinaus war auch das Phycobilisomen assoziierte FNR Protein (Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase, codiert durch *petH*) in der Menge reduziert (Abb. 2-9).

3.4.2.1 Die Linker CpcC2 und CpcD

Die beiden Linker Proteine CpcD und CpcC2 liegen innerhalb der Rods proximal zum Core (de Lorimier *et al.*, 1990a; de Lorimier *et al.*, 1990b; Grossman *et al.*, 1993), (Abb. 3-1). Die Position des CpcD Linkers ist am Ende der Rods, man spricht auch vom „Rod capping Linker“. Seine Funktion ist vermutlich die Begrenzung der Rod Länge. In der Arbeit von Ughy und Ajlani wurden die Gene jedes Rod Linkers in *Synechocystis* durch Insertionsmutagenese inaktiviert (Ughy und Ajlani, 2004). Der *knock-out* des *cpcD* Gens zeigte dabei einen wildtypischen Phänotyp, während alle anderen Kulturen sich vom Wt unterschieden. Insbesondere die knock-outs des *cpcC2* und des *cpcC1* Gens zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie Δ slr1649 Zellen. Auch hier ist das Migrationsverhalten der Phycobilisomen im Sucrose-Gradient ungleich dem des Wt. Durch SDS-PAGE Analyse der isolierten Phycobilisomen aus Δ cpcC2 bzw. Δ cpcC1 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass der CpcD Linker fehlte. Ferner war auch die Menge des FNR Proteins reduziert (Ughy und Ajlani, 2004).

Knock-outs anderer struktureller Phycobilisomen-Komponenten wie der Phycobiliproteine oder des ApcE Linkerproteins zeigen zwar ähnliche Phänotypen in der Zellkultur (hellgrüne Farbe und reduziertes Wachstum), unterscheiden sich aber auf molekularer Ebene von den bereits erwähnten *cpcC1* und *cpcC2 knock-outs* (Ajlani *et al.*, 1995; Elmorjani *et al.*, 1986; Plank *et al.*, 1995). So besitzt z.B. eine von Plank *et al.* charakterisierte Phycocyanin Mutante in *Synechocystis* nur noch die Core-Struktur aus Allophycocyanin.

Im Gegensatz zum *cpcC2 knock-out* ist in Δ slr1649 Zellen das Transkript des *cpcC2* Linkers vorhanden (Abb. 2-14). Des Weiteren ist der CpcC1 Linker in SDS-PAGE Analysen isolierter Phycobilisomen aus Δ slr1649 Zellen nachweisbar. Aufgrund der Lage des Gens *cpcC2* Gens zwischen *cpcA* und *cpcC1* und der von Ughy und Ajlani nachgewiesenen Operon Struktur aus *cpcB*, *cpcA*, *cpcC2*, *cpcC1* sowie *cpcD* ist eine posttranslationale Ursache für das Fehlen des CpcC2 Linkers nahe liegend (Ughy und Ajlani, 2004). Unter Berücksichtigung der Lage des CpcC2 Linkers im Phycocyanin-Rod wird deutlich warum bei einem Fehlen des CpcC2 Linkers mit hoher Wahrscheinlichkeit auch der CpcD Linker betroffen ist. Wie in Abb. 3-1 B dargestellt, verbindet der CpcC2 Linker die terminale Phycocyanin-Disk mit der darunter liegenden Disk. CpcD wiederum bildet den Abschluß des Rods (rod capping linker (van Thor *et al.*, 1999)). Durch das Fehlen des CpcC2 Linkers fehlt wahrscheinlich die terminale

Phycocyanin Disk und mit ihr der daran assoziierte CpcD Linker (Abb. 3-1 C). Daraus ergeben sich verkürzte Rod-Strukturen sowie vermutlich nicht in Phycobilisomen assembliertes freies Phycocyanin, wie in Kap. 3.4. gezeigt. Inwieweit die Rods noch verkürzt sind, lässt sich nicht abschließend klären. Es ist jedoch zu vermuten, dass auch die mittlere Disk betroffen ist (Abb. 3-1 C). Da in gleich langen Rods die verschiedenen Linker in gleichen Mengen vorkommen (siehe auch Abb. 3-1), sind in $\Delta\text{slr1649}$ Phycobilisomen äquimolare Mengen dieser strukturellen Bestandteile, ähnlich den Wt Phycobilisomen, zu erwarten (Abb. 2-9). Neben den fehlenden CpcD und CpcC2 Linkern ist jedoch eine, verglichen mit dem Wt, Abnahme des CpcC1 Linkers zu beobachten. Demgegenüber ist beim CpcG Linker zwischen Wt und $\Delta\text{slr1649}$ Phycobilisomen kein Unterschied zu detektieren. Dies deutet auf ein mögliches Fehlen der mittleren Phycocyanin Disk an einzelnen Rods hin, da der CpcC1 Linker die proximale mit der mittleren Phycocyanin Disk verbindet. Die betroffenen Rods würden demnach nur noch aus einer Phycocyanin Disk bestehen (Abb. 3-1).

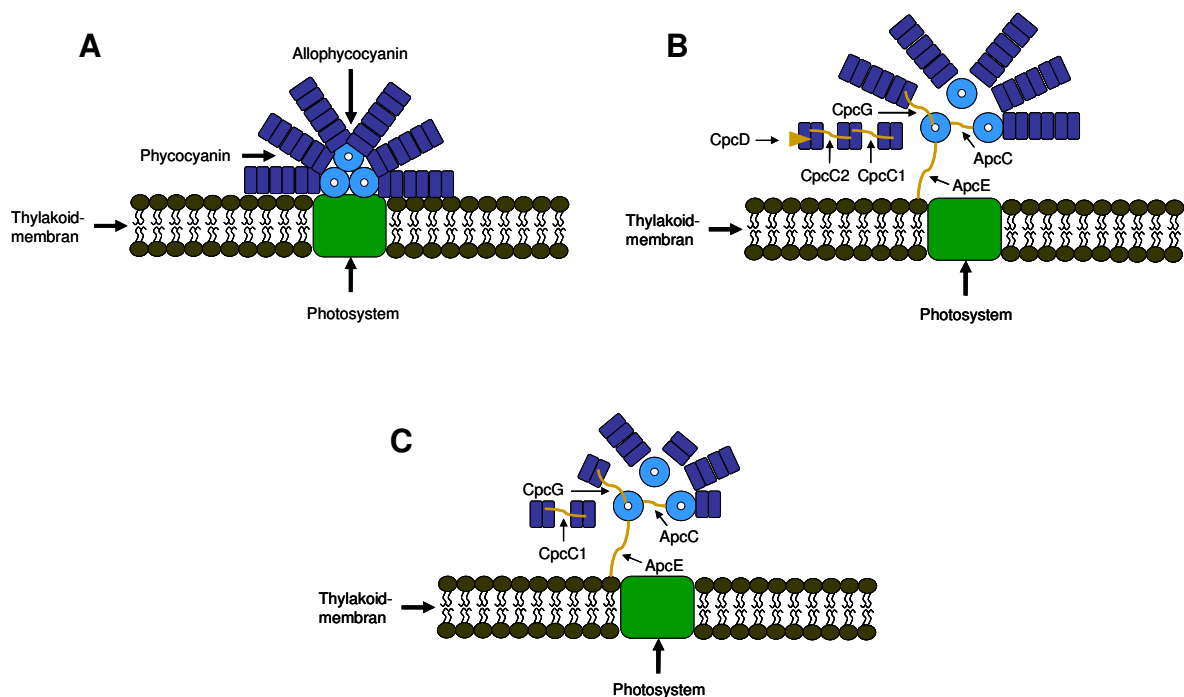


Abb. 3-1: Darstellung der Phycobilisomenstruktur in Wt und mögliche Phycobilisomenstruktur in $\Delta\text{slr1649}$ Zellen. (A) Vereinfachte Darstellung des Aufbaus der Phycobilisomen in Wt *Synechocystis* Zellen. (B) Wie (A), Darstellung jedoch unter Berücksichtigung der Linker Proteine. (C) Mögliche Phycobilisomen Struktur in $\Delta\text{slr1649}$ Zellen. Die Rods bestehen hierbei nur noch aus ein bis zwei Phycocyanin Disks. Die distal gelegenen Linker Proteine CpcC2 und CpcD fehlen völlig. Allophycocyanin ist nicht betroffen

3.4.2.2 Das FNR Protein

Die Funktion des FNR Proteins, welches durch das *petH* Gen codiert wird, ist die Reduktion von NADP^+ zu NADPH. In höheren Pflanzen besitzt dieses Protein eine molekulare Masse zwischen 33 und 36 kDa und zeichnet sich durch den Besitz von FAD in der katalytischen Domäne des Proteins aus (Newman und Gray, 1988; Pschorn *et al.*, 1988). Obwohl den FNR Proteinen höherer Pflanzen sehr ähnlich (Serre *et al.*, 1996), besitzen cyanobakterielle FNR Proteine im Unterschied zu denen höherer Pflanzen noch eine zusätzliche CpcD Domäne am N-Terminus (Fillat *et al.*, 1993; Schluchter und Bryant, 1992; van Thor *et al.*, 1999). Dadurch besitzen cyanobakterielle FNR Proteine eine molekulare Masse zwischen 45 und 50 kDa. Die CpcD Domäne dient möglicherweise der Verankerung des Proteins an der Thylakoidmembran oder den Phycobilisomen (van Thor *et al.*, 1999; van Thor *et al.*, 2000). Die genaue Lokalisation des Proteins ist noch nicht geklärt. Außer einer Assoziation mit den proximalen oder distalen Rods wird auch eine Interaktion mit der Thylakoidmembran diskutiert (Nakajima *et al.*, 2002; Schluchter und Bryant, 1992; van Thor *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der FNR Proteinmenge in isolierten Phycobilisomen bei gleichzeitiger Abwesenheit distaler Rod Linker (Abb. 2-9) legt die Vermutung nahe, dass zumindest ein Teil des FNR Protein Pools mit distalen Rod-Elementen interagiert (siehe auch Kap. 3.4.2.1).

3.4.2.3 Die Phycocyanin β -Untereinheit

Ursächlich für die oben beschriebenen Effekte ist ein weiterer Unterschied auf Protein-Ebene. Neben den fehlenden Linkern ist auch die β -Untereinheit der Phycobilisomen aus $\Delta\text{slr1649}$ Zellen verändert (Abb. 2-10 A und B). Die auf SDS-Gelen sichtbare Massendifferenz, verglichen mit dem Wt, liegt bei ca. 1 kDa. Als Grund könnten einerseits Veränderungen in der Aminosäuresequenz bzw. Veränderungen in den Proteinmodifikationen in Frage kommen, andererseits sind auch Veränderungen auf genomischer Ebene möglich. Letztere konnten jedoch durch PCR Analysen des *cpcB* Gens ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass das *cpcB* Gen in $\Delta\text{slr1649}$ Zellen keine Veränderungen aufweist, was eine posttranslationale Ursache für den Massenverlust wahrscheinlicher macht. Phycobiliproteine zeichnen sich durch das Vorhandensein chromophorer Gruppen, den Bilinen, aus. Die β -Untereinheit des Phycocyanin in *Synechocystis* besitzt je ein Phycocyanobilin

an Position Cys84 bzw. Cys155. Die molekulare Masse eines einzelnen Phycocyanobilins beträgt 587 Da (Schramm und Kroes, 1971). Durch Restriktion der Phycobiliproteine mit Ameisensäure bzw. der Endoproteinase LysC konnte gezeigt werden, dass die chromophore Gruppe an Position Cys155 der Phycocyanin β -Untereinheit in Δ slr1649 Zellen fehlt und deshalb die Masse des Proteins reduziert ist (Abb. 2-12). Die Folgen von Deletionen der Bilin-bindenden Cysteine wurden unter anderem von Toole *et al.* am Phycocyanin des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6701 untersucht (Toole *et al.*, 1998). Hierzu wurden die möglichen Phycocyanobilin-bindenden Cysteine an den Phycocyanin-Untereinheiten durch Mutagenese in Alanine umgewandelt, so dass an der entsprechenden Position keine Konjugation von Phycocyanobilin mehr stattfinden konnte. Dabei zeigte sich sowohl für die Mutation an Cys84 wie auch an Cys155 der Phycocyanin β -Untereinheit ein ähnlicher Phänotyp. Dieser Phänotyp wiederum ähnelt dem in dieser Arbeit beschriebenen Phänotyp des *slr1649 knock-outs*. Im Gegensatz zu den von Toole *et al.* beschriebenen Deletions-Mutanten zeigen Δ slr1649 Zellen jedoch noch geringe Mengen an FNR Protein sowie in Coomassie gefärbten Gelen detektierbare Mengen des CpcC1 Linkers (Abb. 2-9, Kap. 3.4.2.2 und 3.4.2.1).

Um den Einfluß der chromophoren Gruppen auf die Bindungseigenschaften der beiden Phycocyanin Untereinheiten zu charakterisieren, wurden Dissoziationsexperimente durchgeführt (Toole *et al.*, 1998). Nach Zugabe von 1 M KSCN (Kaliumthiocyanat), welches im Wt die Dissoziation der Phycocyanin-Hexamer- bzw. Trimer-Komplexen zu Monomeren verursacht, dissoziierten in den beiden Mutanten, in denen die Cysteine der Phycocyanin β -Untereinheit an Position 155 und 84 durch Alanine ersetzt wurden, auch die Monomere. Dies lässt auf eine geringere Bindungsstärke innerhalb der Monomere schließen. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen der Deletion des zentralen Bilins an Position Cys84, welches sich in der Globin-Domäne des Proteins befindet, und des peripheren Bilins an Position Cys155 (Abb. 1-9). Die chromophore Gruppe an Position Cys84 ist sowohl für eine korrekte Faltung der Globin-Domäne der β -Untereinheit wie auch der Interaktion mit der α -Untereinheit wichtig (Pastore und Lesk, 1990; Schirmer *et al.*, 1985). Dementsprechend ist der Phycocyanin-Gehalt in der Cys84 Mutante, im Vergleich zur Deletionsmutante an Position Cys155 nochmals reduziert, da das dort lokalisierte Phycocyanobilin strukturell „nur“ an der Interaktion der α - und β -Untereinheiten beteiligt ist (Toole *et al.*, 1998).

Unabhängig von der Position der Deletion kommt es sowohl in der Cys84 als auch Cys155

Mutanten zu einer Degradation der fehlerhaften β - und der nicht betroffenen α -Untereinheit. Der Abbau missgefalteter oder nicht assemblierter Phycobiliprotein Untereinheiten ist sehr schnell (Plank und Anderson, 1995; Toole *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang wird die Beteiligung von Chaperonen, wie z.B. der bei den Globinen bekannte DanK/DnaJ/GrpE Komplex, diskutiert (Hayes und Dice, 1996; Kandror *et al.*, 1994; Pastore und Lesk, 1990; Toole *et al.*, 1998). Bisher ist es nicht gelungen, eine Beteiligung dieser Proteinklasse an der Reifung der Phycocyanin-Untereinheiten nachzuweisen.

Im Falle der Δ slr1649 Zellen scheint die veränderte Stabilität der Phycocyanin Monomere und aller höheren Aggregate Einfluß auf die Linker Proteine zu haben. Wie in Kap. 3.4.2.1 beschrieben sind die Phycocyanin-Rods in der Mutante möglicherweise verkürzt (Abb. 3-1 C). Linker Proteine interagieren mit den Phycobiliprotein Disks wahrscheinlich über eine Kombination aus hydrophoben Wechselwirkungen und unterschiedlichen Ladungszuständen im Hohlraum, den die Trimer- bzw. Hexamer-Struktur bildet (Kap. 1.4.2). Es ist nicht auszuschließen, dass die Symmetrie dieser Struktur in der Mutante dahingehend gestört ist, dass eine stabile Interaktion zwischen Linkern und Phycobiliproteinen nicht möglich ist. Da es trotzdem zu einer teilweisen Assemblierung von Phycocyanin in Rod Strukturen kommt, scheint dies nicht alle Linker-Phycobiliprotein Interaktionen gleichermaßen zu betreffen. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder die Instabilität tritt erst ab einer bestimmten Rodlänge auf, bzw. je länger der Rod, desto instabiler ist die Bindung, oder die Symmetrieunterschiede betreffen die Interaktion zwischen CpcC1 bzw. CpcC2 und Phycocyanin mehr als die Interaktion zwischen CpcG und Phycocyanin. Die dritte Disk, welche auch CpcD tragen würde scheint in jedem Fall nicht vorhanden zu sein, was aus dem Fehlen des CpcC2 Linkers in isolierten Δ slr1649-Phycobilisomen abgeleitet werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund des Fehlens der chromophoren Gruppe an Position β Cys155 die Bindungsaffinität zwischen Phycocyanin α - und β -Untereinheit herabgesetzt ist. Daraus resultiert vermutlich eine erhöhte Menge nicht assemblierter Untereinheiten, welche durch einen bisher unbekannten Mechanismus der Degradation zugeführt werden. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Symmetrie der höheren Phycocyanin Aggregate dahingehend beeinflusst wird, dass die Interaktion dieser Strukturen mit Linker Proteinen teilweise stark herabgesetzt ist. Dies manifestiert sich in dem bei Δ slr1649 Zellen beobachteten reduzierten Phycocyanin Gehalt bzw. Phänotyp.

Das Fehlen einer chromophoren Gruppe hat auch Auswirkungen auf die spektroskopischen

Eigenschaften des Proteins. Die drei chromophoren Gruppen des Phycocyanins unterscheiden sich bezüglich ihrer spektroskopischen Eigenschaften. Während die Phycocyanobiline an Position α Cys82 und β Cys82 ihr Absorptionsmaximum zwischen 617 nm und 628 nm besitzen, liegt das Absorptionsmaximum des Phycocyanobilin an Position β Cys155 zwischen 594 nm und 600 nm (Debreczeny *et al.*, 1993; Mimuro *et al.*, 1986). Die in Kap. 2.4 durchgeführten Messungen des Phycocyanin-Gehalts basieren auch auf der Absorption bei 620 nm (Kap. 5.2.9.2). Durch das Fehlen der chromophoren Gruppe an Position β Cys155 ist die Absorption des Phycocyanin Monomers im Bereich 594 nm-600 nm reduziert, die beiden anderen chromophoren Gruppen sind davon jedoch nicht betroffen. Da die beiden Phycocyanobiline an Position α Cys82 und β Cys82 hauptsächlich und die chromophore Gruppe an Position β Cys155 nur zum Teil für die Absorptionseigenschaften bei 620 nm verantwortlich sind, kann davon ausgegangen werden, dass der Fehler der in Abb. 2-7 B erhaltenen Werte für Δ slr1649 Zellen relativ gering sein sollte.

3.5 Slr1649 – eine β -Cys155 Phycocyanobilin Lyase

Aufgrund der fehlenden Phycocyanobilin-Gruppe an Position Cys155 der Phycocyanin β -Untereinheit ist es wahrscheinlich, dass es sich im Falle von Slr1649 um eine Phycocyanobilin Lyase handelt. Diese Lyase ist spezifisch für die Position Cys155, da gezeigt werden konnte, dass alle anderen Phycocyanobilin-Bindestellen der Phycocyanin Untereinheiten vom *knock-out* des *slr1649* Gens nicht betroffen sind (Abb. 2-12). Der Phänotyp der Δ slr1649 Zellen ähnelt darüber hinaus dem anderer Insertionsmutanten von Phycobilin-Lyase Genen (Jung *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2006b). Da das Slr1649 GST-Fusionsprotein in *pull-down* Experimenten wahrscheinlich ausreicht, um mit der Phycocyanin β -Untereinheit zu interagieren, ist Slr1649 möglicherweise funktionell mit der CpeS-Familie verwandt. Die Phycobilin-Lyasen der CpeS-Familie sind in der Lage als Monomer die Ligationsreaktion an das Apo-Protein zu vermitteln (Zhao *et al.*, 2006a). Dabei ist nicht auszuschließen, dass sich die Monomere zu höheren Aggregaten; Homo-Dimere, -Trimere, etc., zusammenlagern und somit dann erst funktionell sind.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von Shen *et al.* bestätigt die hier gewonnenen Ergebnisse. Die Charakterisierung eines Homologen von Slr1649 in *Synechococcus* sp. PCC 7002, CpcT zeigt in einer entsprechenden Insertionsmutante einen ähnlichen Phänotyp wie

Δ slr1649 Zellen (Shen *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte durch *in-vivo* Ligationsexperimente im heterologen *E.coli* System gezeigt werden, dass CpcT in der Lage ist spezifisch Phycocyanobilin an Position Cys155 der β -Untereinheit zu koppeln (Shen *et al.*, 2006).

Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass es sich bei Slr1649 um ein Mitglied der CpcT-Familie handelt. Des Weiteren bestätigen die *in vivo* Ligationsexperimente die oben angeführte Vermutung, dass keine weitere Proteinkomponente nötig ist, um die Ligationsreaktion, ähnlich der Phycobilin-Lyase CpeS zu vermitteln (Zhao *et al.*, 2006a), (Kap. 1.4.3.1).

Somit deutet alles darauf hin, dass die Ligationsreaktion an der Phycocyanin α -Untereinheit von einem Heterodimer (CpcE/CpcF) vermittelt wird, wohingegen die beiden chromophoren Gruppen der β -Untereinheit jeweils von einem Monomer an das Protein gekoppelt werden. Dies ist insofern interessant, da es sich bei allen chromophoren Gruppen um Phycocyanobilin handelt. Darüber hinaus sind die Positionen Cys84 der α - und der β -Untereinheit phylogenetisch miteinander verwandt (Zhao *et al.*, 2006b).

Es wird vermutet, dass der Grund für die relativ hohe Anzahl an Phycobilin-Lyasen neben unterschiedlichen Phycobilinen auch in der Stereochemie der einzelnen Biline liegt (Shen *et al.*, 2006). So unterscheiden sich z.B. die Phycocyanobiline an Position Cys84 und Cys155 des Phycocyanins in der Konformation des C₃¹ Atoms. Weiterhin unterscheiden sich auch die Bindungsstellen an der β -Untereinheit aufgrund ihrer Position im Protein (Abb. 1-9).

Trotzdem scheint es auch hier Ausnahmen zu geben. In *Anabaena* sp. PCC 7120 wird die Ligation des Phycocyanobilins sowohl an Position Cys84 der Phycocyanin β -Untereinheit wie auch der Phycoerythrocyanin β -Untereinheit allein durch CpeS vermittelt (Zhao *et al.*, 2006a). In *Synechococcus* sp. 7002 konnte dagegen gezeigt werden, dass die Reaktion an der analogen Position Cys84 der Phycocyanin β -Untereinheit durch ein Heterodimer CpcS/CpcU vermittelt wird, wobei CpcS homolog zu CpeS ist (Shen *et al.*, 2006).

Alle bisher beschriebenen Phycobilin-Lyasen sind spezifisch für die Ligation von Phycocyanobilin. Bis auf eine Ausnahme ist für alle anderen Biline, insbesondere die der Cryptophyten, die korrespondierende Phycobilin-Lyase unbekannt. In *Calothrix* sp. gelang durch Transposon Mutagenese im *cpeY* Gen die Generierung eines Phänotyps ähnlich dem aus anderen Phycobilin-Lyase *knock-outs* (Kahn *et al.*, 1997). Genauere Untersuchungen, wie z.B. Ligations Experimente in einem heterologen *E. coli* System, fehlen jedoch.

Weitere Funktionen der Bilin-Lyasen außer den hier beschriebenen sind nicht auszuschließen. Als Beispiel hierfür dient die heterodimere Phycocyanobilin-Lyase PecE/PecF, welche neben

der Lyase auch eine Isomerase-Funktion besitzt (Storf *et al.*, 2001). Eine mögliche weitere Eigenschaft dieser Enzymklasse wäre z.B. die in Kap. 3.4.2.3 erwähnte Chaperon-Funktion.

3.6 Phylogenetische Analysen

Aminosäuresequenzvergleiche des Slr1649 zeigen, dass Homologe nicht nur in Cyanobakterien vorkommen, sondern in vielen photosynthetischen Organismen, vornehmlich denen, die Phycobiliproteine enthalten. Allen Homologen gemeinsam ist eine DUF1001 Domäne, die auf eine funktionelle Verwandschaft hindeutet. Neben den Homologen in Organismen mit Phycobiliproteinen existieren auch Homologe mit geringer Sequenzidentität wie Crumpled Leaf in den höheren Pflanzen *Arabidopsis thaliana* bzw. *Oryza sativa*. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei Slr1649 mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Phycocyanin- β 155-Phycocyanobilin-Lyase handelt und weder in *Arabidopsis thaliana* noch *Oryza sativa* Phycobiliproteine vorkommen, ist die funktionelle Verwandschaft, die durch die gemeinsame DUF1001 Domäne (*domain of unknown function* 1001) nahe liegt, fraglich.

Höhere Pflanzen besitzen keine Phycobiliproteine, aber Phytochrome, die mit den Phycobiliproteinen strukturell verwandt sind. Diese Phytochrome zeichnen sich ähnlich der Phycobiliproteine durch den Besitz chromophorer Gruppen aus. Im Gegensatz zu diesen geschieht die Ligation dieser chromophoren Gruppen autokatalytisch über eine Domäne innerhalb des Proteins (Hughes *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 1997).

Die Charakterisierung einer homozygoten *crumpled leaf* (at5g51020.1) *knock-out*-Pflanze in *A.thaliana* zeigte Fehlentwicklungen in Zelldifferenzierung und in der Teilung der Chloroplasten (Asano *et al.*, 2004). Diese Phänotypen im *A.thaliana*-System konnte bei Cyanobakterien weder im *Synechococcus cpcT*, noch im *Synechocystis slr1649 knock-out* nachgewiesen werden, was eine andere Funktion für At5g51020.1 nahe legt. Es ist trotzdem nicht auszuschließen, dass die beiden Gruppen CpcT/Slr1649 und At5g51020.1 phylogenetisch miteinander verwandt sind. Auch Plastiden der höheren Pflanzen gehen auf ein während der primären Endosymbiose in einem heterotrophen Wirt etabliertes ancestrales Cyanobakterium zurück (Douglas und Gray, 1991). Dieses besaß möglicherweise die Fähigkeit zweier Lichtsammelkomplexe: LHCs und Phycobilisomen (Tomitani *et al.*, 1999). Die grüne Linie, aus der sich die heutigen Landpflanzen entwickelten, verlor jedoch die Phycobilisomen und nutzt nur noch LHCs. Damit ging der Verlust von Proteinen, die am Aufbau und der

Reifung der Phycobilisomen beteiligt waren, einher (z.B. Linker oder Phycobiliproteine).

Möglicherweise nehmen die Proteine mit DUF1001 Domäne in diesen Organismen im Laufe der Evolution eine andere Funktion wahr als ihre Homologen in Organismen mit Phycobiliproteinen. Andererseits könnte auch eine weitere noch nicht bekannte Funktion der Phycobilin-Lyasen der Grund sein, weshalb diese Proteine in Organismen ohne Phycobiliproteine noch vorhanden sind.

3.6.1 Slr1649 Homologe in Cyanobakterien

Betrachtet man nur cyanobakterielle Organismen, so fällt auf, dass die Anzahl der Homologen in den einzelnen Spezies unterschiedlich ist. Dabei ist eine bedingte Korrelation mit der Anzahl verschiedener Phycobiliproteine, ausgenommen Allophycocyanin, festzustellen (Tab. 2-1). Diese Homologen unterscheiden sich jedoch untereinander deutlich bezüglich ihrer Homologie. Basierend auf den *Expect value* Daten aus Tab. 2-1, welche auf Homologien mit dem Slr1649 Protein beruhen, zeigt sich in Phycocyanin-haltigen Organismen immer ein homologes Protein, welches sich von den anderen Homologen, wenn vorhanden, durch eine höhere Identität mit dem Slr1649 abhebt. Somit lassen sich aus den in Tab. 2-1 aufgeführten Homologen mindestens zwei Gruppen bilden: Die CpeT-Gruppe und die Slr1649-Gruppe. Die Slr1649-Gruppe scheint spezifisch für Phycocyanin zu sein, da in Organismen, die neben Allophycocyanin nur Phycocyanin besitzen wie z.B. *Synechocystis* sp. PCC 6803 oder *Thermosynechococcus elongatus*, auch nur ein homologes Protein mit hoher Identität zu finden ist. Ebenso scheint die CpeT-Gruppe spezifisch für Phycoerythrin, da in ausschließlich Phycoerythrin-haltigen Organismen, wie z.B. *Prochlorococcus marinus*, das einzige homologe Protein eine, bezogen auf Slr1649, relativ niedrige Identität besitzt.

Stammbaum Analysen bestätigen dieses Ergebnis (Shen *et al.*, 2006) (Abb. 3-1). Auch hier lassen sich mindestens zwei Gruppen identifizieren, die CpeT- und die CpcT/Slr1649-Gruppe. Wie in Tab. 2-1 zu sehen, besitzen manche Cyanobakterien drei CpcT/Slr1649 Homologe. Von diesen dreien lässt sich jeweils ein homologes Protein der CpcT-Gruppe bzw. der CpeT-Gruppe zuordnen. Vergleicht man die in Tab. 2-1 aufgelisteten Homologen mit denen in Abb. 3-1, ist zu erkennen, dass sich der dritte Homologe ebenfalls in der CpcT-Gruppe befindet. Somit entsteht in einigen Organismen eine Situation, in der es möglicherweise zwei Lyasen für Position Cys155 der Phycocyanin β -Untereinheit gibt, wie z.B. *Nostoc punctiformes* PCC 73102 oder *Gloeobacter* sp. PCC 7421. Eine mögliche Erklärung

hierfür sind Derivate der einzelnen Phycobiliproteine, wie z.B. R-Phycocyanin II. Dieses kommt in *Synechococcus* Stämmen vor und unterscheidet sich von C-Phycocyanin durch ein Phycoerythrobilin an Position Cys84 der α -Untereinheit sowie an Position Cys155 der β -Untereinheit (Ong und Glazer, 1987). Aufgrund der hohen Spezifität der Bilin Lyasen (siehe Kap. 3.5) erfordern die beiden Phycoerythrobiline wahrscheinlich mindestens ein weiteres Enzym in diesen Organismen. Eine zusätzliche Funktion der Proteine aus der CpcT-Gruppe ist jedoch nicht auszuschließen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Proteinen der hier untersuchten CpeT- und der CpcT-Gruppe in Cyanobakterien ist der genomische Kontext, in dem sich die entsprechenden Gene befinden. Die Gene der CpcT-Gruppe zeigen bezüglich der Lokalisation im Genom eine eher zufällig erscheinende Anordnung. Ausgenommen hiervon sind die CpcT Homologen in den beiden *Synechococcus* Stämmen WH 8102 und CC 9902 sowie in *Gloeobacter violaceus*. In diesen Fällen liegt das homologe Gen im Phycocyanin-Operon in unmittelbarer Nachbarschaft zu

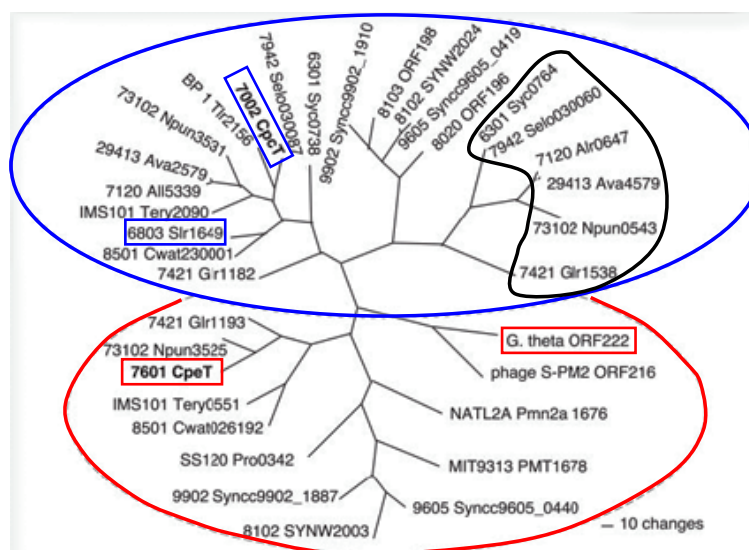


Abb. 3-1: Phylogenetische Analyse des CpcT/Sir1649 Proteins (Shen *et al.*, 2006). Die Mitglieder der CpcT-Gruppe sind blau umrandet, wohingegen die Mitglieder der CpeT-Gruppe rot umrandet sind. Innerhalb der CpcT Gruppe wäre eine weitere Unterteilung möglich (schwarz umrandet). *Synechococcus* sp. PCC 7002 (7002), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (6803), *Anabaena* sp. PCC 7120 (7120), *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (BP-1), *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (7421), *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (7942), *Synechococcus* sp. PCC 6301 (6301), *Calothrix* PCC 7601 (F. diplosiphon) (7601), *Prochlorococcus marinus* SS120 (SS120), *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (MIT9313), *Prochlorococcus* sp. CC9605 (9605), *Prochlorococcus* sp. CC9902 (9902), *Prochlorococcus marinus* strain NATL2A (NATL2A), *Synechococcus* sp. WH8102 (8102), *Synechococcus* sp. WH8103 (8103), *Crocospheera watsonii* WH8501 (8501), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (73102), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (29413), *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (IMS101), *Guillardia theta* (G. theta), Bacteriophage S-PM2 (phage S-PM2).

den Phycocyanin Untereinheiten (Tab. 2-2). Demgegenüber sind die Gene der CpeT-Gruppe meistens downstream von *cpeS* und upstream von *cpeR* angeordnet (Tab. 2-2).

Betrachtet man andere Komponenten der Phycobilisomen, so fällt auf, dass diese in Operon Strukturen angeordnet sind. So befinden sich z.B. in *Synechocystis* sp. PCC 6803 die Gene der Phycocyanin α - und β -Untereinheit zusammen mit den Genen der drei Linker Proteine CpcC1, CpcC2 und CpcD auf einem Transkript (Ughy und Ajlani, 2004), (Kap. 2.5.4). Auch in anderen Cyanobakterien, wie z.B. *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, *Crocospira watsonii* WH 8501 oder *Synechococcus* sp. WH 8102 gibt es diese oder eine ähnliche Anordnung. Ebenso zeigen *in-silico* Analysen der cyanobakteriellen Genome von *Anabaena* sp. PCC 7120, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 sowie *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 eine Tandem-Anordnung für die Gene der beiden Phycocyanobilin-Lyase-Untereinheiten CpcE und CpcF. Darüber hinaus sind diese Gene im jeweiligen Phycocyanin-Operon lokalisiert. Für den genomischen Kontext der CpcT-Lyase wäre somit zumindest eine Lokalisation im oder nahe des Phycocyanin Operon, wie sie das *cpeT* Gen zeigt, zu erwarten gewesen (Tab. 2-2).

3.6.2 CpeT, eine mögliche Phycoerythrobilin Lyase

Für die CpeT-Gruppe, zu der auch Orf222 aus *G.theta* gezählt werden kann, ist nach der weitgehenden Analyse des CpcT Proteins eine ähnliche Funktion zu vermuten. Neben den *in-silico* Analysen dieser Arbeit konnte schon früher eine funktionelle Korrelation zwischen Phycobilisomen bzw. Phycobiliproteinen und CpeT experimentell gezeigt werden. In *Calothrix* sp. konnte ein polycistronisches Transkript mit den Genen *cpeE* (ein Linker Protein), *cpeS*, *cpeT* und *cpeR* nachgewiesen werden. Des Weiteren steht dieses Operon unter der Kontrolle eines Promotors, der durch grünes Licht induziert wird (Cobley *et al.*, 2002). Da die Phycobilisomen vor allem in der Grünücke des Chlorophylls absorbieren und zumindest das *cpeE* Gen dieses Operons für einen strukturellen Bestandteil der Phycobilisomen codiert, ist zu vermuten, dass auch zwischen dem Produkt des *cpeT* Gens und den Phycobilisomen bzw. Phycobiliproteinen eine funktionelle Verbindung besteht. Eine andere als die Phycobilin-Lyase Funktion erscheint für die CpeT Gruppe möglich, aufgrund der hohen Sequenzidentität und den oben beschriebenen Ergebnisse aber unwahrscheinlich. Im Falle dieser Protein Gruppe handelt es sich somit vermutlich um eine Phycoerythrin- β 165-Phycoerythrobilin-Lyase (β 165 in Phycoerythrin ist äquivalent zu β 155 in Phycocyanin), was jedoch experimentell noch gezeigt werden muß.

Auffallend in diesem Zusammenhang ist das Fehlen eines CpeT-homologen Proteins im *Prochlorococcus marinus* Stamm MED4 (Rocap *et al.*, 2003). Da diese Organismengruppe zwar keine Phycobilisomen, aber wie alle anderen *Prochlorococcaceae* auch, Phycoerythrin besitzt, wäre das Vorhandensein einer oder mehrerer verschiedener Phycobilin-Lyase für die insgesamt 5 Phycobiline an den beiden Phycoerythrin Untereinheiten zu erwarten gewesen (siehe auch Kap. 1.4.3). Durch Steglich *et al.* konnte kürzlich jedoch gezeigt werden, dass in diesem Stamm das Cystein an Position 165 der Phycoerythrin β -Untereinheit fehlt und somit eine Lyase für diese Position nicht benötigt wird (Steglich *et al.*, 2005).

Wie in den phylogenetischen Analysen in Abb. 3-1 zu sehen, befindet sich neben Orf222 auch der Homologe aus dem Bakteriophagen S-PM2 in der CpeT-Gruppe. Dieser Bakteriophage gehört zur Gruppe der Cyanomyoviren und infiziert vor allem *Synechococcus* und die mit ihnen verwandten *Prochlorococcus* Spezies (Mann *et al.*, 2005; Waterbury und Valois, 1993). Neben Genen für *psbA* und *psbB*, beides Core-Komponenten der beiden Photosysteme, besitzen sie auch einen Homologen zu *cpeT*. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Gene kurz nach der Infektion einer Wirtszelle in hohem Maße transkribiert werden und diese Transkription bis zur Lyase der Zelle anhält (Clokier *et al.*, 2006). Der Besitz photosynthetischer Gene ist keineswegs obligatorisch für Bakteriophagen, die Cyanobakterien infizieren, wie das Beispiel des Phagen P60 zeigt, welcher keinerlei photosynthetische Gene besitzt (Chen und Lu, 2002). Durch den Besitz der beiden Komponenten des Photosystems und der putativen Phycoerythrobilin-Lyase CpeT ist der Bakteriophage S-PM2 wahrscheinlich in der Lage, die Photosyntheseleistung weiter zu steigern, was wiederum zu mehr Energie- und Reduktionäquivalenten für den Replikationszyklus führt. Möglich ist auch, dass die Produkte dieser Gene einer Abwehrreaktion des Wirtes, wie z.B. durch Einschränken der Photosyntheseleistung, entgegenwirken sollen.

3.6.3 Orf222/CpeT von *Guillardia theta*

Wie alle Cryptophyten enthält auch *G. theta* nur eine Phycobiliprotein-Spezies, hier Phycoerythrin 545 (Wilk *et al.*, 1999). Dieses Phycobiliprotein besitzt an der α -Untereinheit eine Dihydrobiliverdin Gruppe und an der β -Untereinheit drei Phycoerythrobiline. Somit werden vermutlich auch nur Phycoerythrin 545-spezifische Phycobilin Lyasen benötigt. Folgt man der Argumentation von Swanson und Zhao und den Untersuchungen an Phycocyanin Lyasen in Cyanobakterien, sind somit in *G. theta* bis zu vier Bilin-Lyase zu erwarten (Fairchild

et al., 1992; Shen *et al.*, 2006; Swanson *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2006a). Orf222 stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit solch eine Phycoerythrin-Lyase dar. *In-silico* Analysen zeigen signifikante Homologien zu den Phycocyanobilin Lyasen Slr1649 in *Synechocystis* und CpcT in *Synechococcus*. Wie in Abb. 3-1 dargestellt, gruppiert Orf222 innerhalb des Stammbaums in die CpeT-Gruppe. Wahrscheinlich ist Orf222 spezifisch für die Ligationsreaktion an Position Cys158 der Phycoerythrin β -Untereinheit verantwortlich, eine Position analog zu Cys155, in der Phycocyanin β -Untereinheit von *Synechocystis*. Aufgrund seiner vermuteten Funktion sollte in *G.theta* Orf222 eher als CpeT Protein bezeichnet werden.

Das auf Chromosom 1 des Nukleomorph codierte CpeT Protein besitzt ein vorhergesagtes Transitpeptid. Da sich Homologe vor allem in Cyanobakterien finden, also prokaryoten Ursprungs sind, ist eine Lokalisation des Proteins in der Plastide zu erwarten. Unterstützt wird dies durch die in dieser Arbeit beschriebene wahrscheinliche Funktion des Homologen in *Synechocystis* als Phycobilin-Lyase. Es ist bisher kein eukaryoter Organismus mit Phycobiliproteinen bekannt, in dem die entsprechenden β -Untereinheiten nicht in der Plastide codiert sind. Daher müssen sehr wahrscheinlich auch alle Komponenten und Enzyme, die an der Reifung der β -Untereinheiten beteiligt, aber nicht mehr in der Plastide codiert sind, wie z.B. Phycobilin-Lyasen, in das Organell importiert werden.

Auf dem Genom des Nukleomorph konnten keine weiteren Homologen bekannter Lyasen identifiziert werden. Die Gene dieser Enzyme sind möglicherweise im Zuge der Evolution in den Wirts-Nukleus transferiert worden. Unterstützt wird diese Annahme von der Sequenz eines ESTs aus *G. theta* (Accession-Nr.: AM183804), welches sowohl Homologie zu CpeZ wie auch eine vorhergesagte BTS (bipartite translocation signal) besitzt. Die BTS ist typisch für Nukleus codierte und Plastide lokalisierte Proteine und deutet deshalb auf einen Transport über die vier Membranen der komplexen Plastide in *G. theta* hin (Gould *et al.*, 2006a; Gould *et al.*, 2006b). CpeZ ist vermutlich gemeinsam mit CpeY an der Ligation eines Phycoerythrobilins an die Phycoerythrin α - oder β -Untereinheit im Cyanobakterium *Calothrix* sp. beteiligt (Kahn *et al.*, 1997).

Phycoerythrin α -Untereinheiten in Cryptophyten zeigen keinerlei Homologie zu α -Untereinheiten in Rotalgen oder Cyanobakterien und sind verglichen mit diesen verkürzt (Sidler *et al.*, 1990). Darüber hinaus ist in *G.theta* an der Position des Bilins der α -Untereinheit kein Phycoerythrobilin, sondern ein Dihydrobiliverdin ligiert (Wedemayer *et al.*, 1996). Berücksichtigt man die Spezifität dieser Enzym Klasse, so ist es unwahrscheinlich, dass die

Ligation unterschiedlicher Biline an unterschiedliche Phycobiliprotein Untereinheiten von ähnlichen Lyasen vermittelt werden.

Das Vorkommen des putativen Lyase-Dimers CpeY/CpeZ in *G.theta* lässt eher vermuten, dass es sich um eine Phycoerythrin β -Untereinheit spezifische Lyase handelt. Die Phycobiliprotein β -Untereinheiten der Cryptophyten sind, im Gegensatz zu den α -Untereinheiten, phylogenetisch mit den β -Untereinheiten von Cyanobakterien und Rotalgen verwandt.

Die noch fehlende Komponente CpeY sollte durch weitere Sequenzanalysen der *G. theta* EST Bibliothek zu identifizieren sein. Gleiches gilt für weitere Phycoerythrin-spezifische Lyasen.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Von den auf dem Nukleomorph der Cryptophyte *Guillardia theta* codierten Proteinen besitzen 11 Homologien zu cyanobakteriellen Proteinen unbekannter Funktion. Durch die Charakterisierung dieser putativ Plastiden-lokalisierten Orfs können nicht nur die Funktion dieser Proteine entschlüsselt, sondern auch Einblicke in das komplexe Zusammenspiel der vier unterschiedlichen Genome von *Guillardia theta* gewonnen werden.

Die Funktion des in dieser Arbeit untersuchten Orf222 wurde mit Hilfe eines im Modellsystems *Synechocystis* sp. PCC 6803 generierten homogenomischen *knock-outs*, aufgeklärt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Homologe von Orf222 in *Synechocystis*, Slr1649, eine Phycocyanobilin-Lyase ist, welche spezifisch Phycocyanobilin an Position Cys155 der β -Untereinheit des Phycocyanins ligiert. Dabei scheint im Unterschied zu den meisten anderen Phycobilin-Lyasen nur Slr1649 an der Ligationsreaktion beteiligt zu sein.

Homologe dieser Lyase findet man in vielen cyanobakteriellen, aber auch in einigen eukaryoten Organismen. In Cyanobakterien fällt eine Korrelation zwischen der Anzahl der Phycobiliproteine (ausgenommen Allophycocyanin) und der Anzahl der Slr1649 Homologen auf. Diese Homologen ließen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die Slr1649-Gruppe ist für die spezifische Ligation von Phycocyanobilin an die β -Untereinheiten des Phycocyanins zuständig, während die Mitglieder der CpeT-Gruppe, zu der auch Orf222 gezählt werden kann, vermutlich die spezifische Ligation von Phycoerythrobilin an konservierten Cysteinen der Phycoerythrin β -Untereinheit bewirken. Es würde sich somit um Phycoerythrobilin-Lyasen handeln.

Trotz der funktionellen Verwandtschaft unterscheiden sich beide Gruppen auf genomischer Ebene. Während die Gene der CpeT-Gruppe bezüglich des Gen-Locus einen weitgehend konservierten genomischen Kontext besitzen, sind die Gene der CpcT-Gruppe diesbezüglich sehr divergent.

Neben der putativen Phycoerythrobilin-Lyase Orf222 (CpeT) wurde in einer EST-Bibliothek von *Guillardia theta* das Transkript einer weiteren putativen Phycoerythrobilin Lyase entdeckt, nämlich CpeZ. Das *cpeZ* Gen ist, im Unterschied zu Orf222, jedoch im Nukleus des Wirtes lokalisiert.

5 METHODEN UND MATERIAL

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Der überwiegende Teil der Chemikalien wurde von den Firmen Roth (München), Sigma-Aldrich (München) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Abweichungen hierzu sind, wenn nötig, im Text kenntlich gemacht.

5.1.2 Standardpuffer und Lösungen

10 x TBE:	Tris-HCl, pH 8,8	1,34 M
	Borsäure	0,44 M
	Na ₂ EDTA	25 mM

Ladepuffer DNA:	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
	Na ₂ EDTA	50 mM
	Harnstoff	4 M
	Saccharose	50 % (w/v)

5.1.3 Membranen

HybondN	GE Healthcare, München
HybondP	GE Healthcare, München
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel

5.1.4 Molekularbiologische Kits

<i>JETsorb DNA extraction Kit</i>	Genomed, Bad Oeynhausen
<i>Plasmid-Midi/Maxi-Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP</i>	GE Healthcare, München

<i>TransformAID™ Bacterial Transformation-Kit</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>pGEM[®]-T Vector System I</i>	Promega, Mannheim
<i>SuperSignal[®] West Pico Chemoluminescent Substrate Kit</i>	Perbio, Rockford
<i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i>	Roche, Mannheim

5.1.5 Enzyme

DNAse I (10 U/ml)	Sigma-Aldrich, München
RNAse A (30 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München
Taq DNA Polymerase (5000 U/ml)	Eppendorf, Hamburg
T4 DNA Ligase (1000 U/ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

5.1.6 Längenstandards

Längenstandards für Nukleinsäuren und Proteine wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

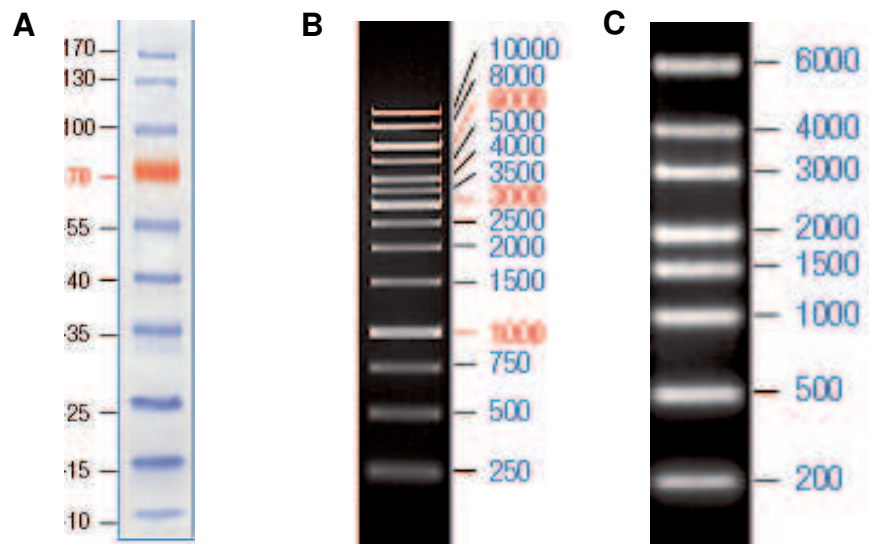


Abb. 5-1: (A) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (B) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (C) Ribo Ruler™ RNA Ladder High, Range. Alle MBI-Fermentas (St. Leon-Roth).

5.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Sequenzierprimer die mit dem LICOR 4200 verwendet wurden, waren mit IRD800- (800 nm Kanal) bzw. IRD700- Farbstoff (700 nm Kanal) markiert.

Name	Sequenz	Modifikation
M13 universal	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'	IRD700/IRD800
M13 reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'	IRD700/IRD800
T7/2_800	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	IRD800
pGEX-5X-3 universal	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'	IRD800
pGEX-5X-3 Reverse	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'	IRD700

Primer für spezifische Amplifikationen wurden ohne Modifikationen synthetisiert. Für bestimmte Klonierungsexperimente enthielten Oligonukleotide spezifische Restriktionsschnittstellen, welche in der unteren Tabelle entsprechend vermerkt sind.

Name	Sequenz	Schnittstelle	T _M
cpcA-5'	5'- <u>CAT ATG</u> AAA ACC CCT TTA ACT GAA-3'	<i>NdeI</i>	58,1 °C
cpcA-3'	5'- <u>GAA TTC</u> CTA GCT CAG AGC ATT GAT -3'	<i>EcoRI</i>	61,3 °C
cpc B-5'	5'- <u>CAT ATG</u> TTC GAC GTA TTC ACT CGG-3'	<i>NdeI</i>	63,0 °C
cpcB-3'	5'- <u>GAA TTC</u> CTA GGC TAC GGC AGC AGC-3'	<i>EcoRI</i>	67,9 °C
1649-5'	5'- <u>CAT ATG</u> TCC CAT TCC ACT GAT CTT-3'	<i>NdeI</i>	59,7 °C
1649-3'	5'- <u>GAA TTC</u> CTA AAA ACT AAC TTC ATC-3'	<i>EcoRI</i>	58,5 °C
222ex_5'	5'- <u>GGA TCC</u> ATT TAT TTA TAA ACT GT-3'	<i>BamHI</i>	51,7 °C
222ex_3'	5'- <u>CTC GAG</u> TTA AAA TTT AAA GTC TTG TTT TTC-3'	<i>XhoI</i>	58,6 °C

sll1579-5'	5'-GTA CCG GCA GAA GTT TTT CC-3'		57,3 °C
sll1579-3'	5'-GGA ACC ATT TCC CTG GGA ACG-3'		61,3 °C
t1649A-5'	5'-CGG GAT TAA TTA GCC TCG ACC GTG G-3'		66,3 °C
t1649A-3'	5'- <u>GGA TCC</u> AAA ACT AAC TTC ATC GGC G-3'	<i>Bam</i> HI	63 °C
t1649B-5'	5'- <u>AAG CTT</u> TTA GCC AGC CTC GAC TTT GTT G-3'	<i>Hind</i> III	65,1 °C
t1649B-3'	5'-CCG TTA TTA ATT TTG TTA ACT TGG C-3'		56,4 °C
Syn_16S_5'	5'-CGT CTG AAG ATG GGC TCG CGT CTG-3'		67,8 °C
Syn_16S_3'	5'-CTG GCT CCC TAA GGC ACT CCC ACG-3'		69,6 °C

5.1.8 Vektoren

pGEM-T Vector	Ampr, lacZ', PT7, PSP6, (Promega, Mannheim).pUC57/T
pGBKT7	GAL4(1-147), DNA-BD, TRP1, Kanr, (Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye)
pGADT7	GAL4, LEU2, PADH1, Ampr, TADH1, (Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye)
pGEX-5X-3	Ampr, lacIq, ptac, pBR322ori, gst (GE Healthcare, München)
pBlueScript II KS +	Ampr, lacZ', f1ori, pUCori, PT7, PT3 (Stratagene Europe, Amsterdam)
pBS1479	Rigaut, G. et al. (1999)

5.1.9 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> XL1 Blue MRF'	(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔ15 Tn5 (Kan ^r)], (Stratagene Europe, Amsterdam)
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	dcm ompT hsdS(rB-, mB-) gal (ΔcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1), (Stratagene Europe, Amsterdam)

5.1.10 Hefestämme

AH-109	MAT _a , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ., LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} , GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3::MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ, MEL1 (Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye, James et al., 1996)
Y-187	MAT _α , ura3- 52, his3- 200, ade2- 101, trp1- 901, leu2- 3, 112, gal4Δ, met ⁻ , gal80Δ., URA3 GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ, MEL1 (Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye, Harper et al., 1993)

5.1.11 Kulturmedien

5.1.11.1 *E.coli* Kulturmedium

LB-Medium (pro Liter):	Bacto Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl ₂	10 g

Selektionsmarker	Endkonzentration
Ampicillin	50-100 µg/ml
Kanamycin	20 µg/ml
Tetracyclin	15 µg/ml

Für die Herstellung von LB-Platten wurden 15 g Bacto-Agar pro Liter LB-Medium eingewogen. Nach Autoklavieren wurde bei einer Mediumtemperatur von ca. 50 °C der entsprechende Selektionsmarker zugegeben.

Zur Herstellung selektiver X-Gal-IPTG-Ampicillin-Platten wurde zusätzlich -X- β -Gal und IPTG hinzugefügt (Endkonzentration jeweils 40 μ g/ml)

5.1.11.2 *Guillardia theta* Kulturmedium (f/2-Medium)

(Guillard und Ryther, 1962; Guillard, 1975)

f/2-Grundlösung: Meersalz (Tropic Marine) 30,0 g/l

NaNO_3 0,075 g/l

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,006 g/l

Tris 0,602 g/l

Der pH-Wert wird mit HCl-Lösung auf pH 7,2 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

f/2 Spurenelement-Stammlösung: $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 11,65 mmol/l

Na_2EDTA 11,71 mmol/l

$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,039 mmol/l

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,077 mmol/l

$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,042 mmol/l

$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,91 mmol/l

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,026 mmol/l

Jede Substanz musste gelöst sein, bevor die nächste zugesetzt wurde. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt. Der pH-Wert betrug etwa 2,0.

f/2 Vitamin-Stammlösung:	Biotin	0,0020 mmol/l
	Cyanocobalamin	0,00037 mmol/l
	Thiamin-HCl	0,297 mmol/l

Die Vitamin-Stammlösung wurde sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

5.1.11.3 Hefe Kulturmedium

YPDA-Medium (pro Liter):	Pepton	20 g
	Hefe-Extrakt	10 g
	0,2 % Adenin-Hemisulfat	15 ml
	Agar (für Platten)	20 g

Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Danach wurden 50 ml 40 %ige Glukose zugegeben (Endkonzentration 2 %).

PEG/LiAc-Lösung (EV 10 ml):	50 % PEG	8 ml
	TE-Puffer (10x)	1 ml
	1 M LiAc (10x)	1 ml
TE/LiAc-Lösung (EV 10 ml):	TE-Puffer (10x)	1,1 ml
	1 M LiAc (10x)	1,1 ml
	H ₂ O	7,8 ml

SD-Medien (pro Liter):	Yeast nitrogen base without amino acids	6,7 g
	Agar (für Platten)	20 g

Nach Bedarf wurden entsprechende Dropouts zugegeben: (-Leu); (-Trp); (-Leu, -Trp), (-His; -Leu, -Trp), (-Leu, -Trp, -His, -Ade)

Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml 40 %ige Glukose zugegeben (Endkonzentration 2 %)

5.1.11.4 *Synechocystis* sp. PCC 6803 Kulturmedium (BG-11 Medium)

Die Kulturen wurden unter Standard Bedingungen gehalten. Diese sind: Dauerlicht der Intensität 2000 lux, Raumtemperatur 30 °C, atmosphärische CO₂ Konzentration und Inkubation auf einem Orbitalschüttler.

BG11-Kulturmedium:	100 x Bg11-Stammlösung	10 ml/l
	Na ₂ CO ₃ Stammlösung	1 ml/l
	K ₂ HPO ₄ 3 H ₂ O Stammlösung	1 ml/l
	TES, pH 7,4 Stammlösung	5 ml/l
	Fe (III)(NH ₄) ₂ -Citrat Stammlösung	1 ml/l
	Agar (für Platten)	0,6 % (w/v)

100 x BG11-Stammlösung (autoklaviert):	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25 mM
	Zitronensäure	3 mM
	NaNO ₃	1,77 M
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30 mM
	Na ₂ -EDTA	0,3 mM

Weitere Stammlösungen:	Na_2CO_3 (autoklaviert)	190 mM
	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (autoklaviert)	180 mM
	TES pH 7,4 (autoklaviert)	1 M
	$\text{Fe (III)(NH}_4)_2\text{-Citrat}$ (sterilfiltriert)	30 mM

Spurenelementlösung A5+Co:	H_3BO_3	2,86 g/l
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,81 g/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,222 g/l
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,390 g/l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,079 g/l
	$\text{Co(NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,049 g/l

5.1.12 Geräte

5.1.12.1 PCR-Thermocycler

MasterCyclerGradient (Eppendorf, Hamburg)

MasterCyclerPersonal (Eppendorf, Hamburg)

5.1.12.2 Sequenzierautomat

LI-COR 4200 (MWG, Ebersberg)

5.1.12.3 Zentrifugen

Sorvall®RC-5B (Sorvall, Bad Homburg)

Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)

Centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)

Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg)

Centrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg)

Centrikon T-2060 (Kontron Instruments)

5.1.12.4 Power Supplies

Electrophoresis Power supply EPS 301

Electrophoresis Power supply EPS 601

5.1.12.5 Sonstige Geräte

GelDoc 1000 (BioRad, München)

Spektralphotometer Ultrospec III (GE Healthcare, München)

UV-Lampe MinUVIS 254 nm/366 nm (DESAGA, Heidelberg)

Biomed Thermocycler (Bachofer, Reutlingen)

Semidry transfer unit TE 77 (GE Healthcare, München)

Taumelschüttler TRM-V (MAGV, Rabenau)

Gradientenmischer Ismatec IPS 8 (Heinemann Laborgeräte, Schwäbisch-Gmünd)

Branson Sonifier 250 (Heinemann Laborgeräte, Schwäbisch-Gmünd)

5.1.12.6 Software

Zur Analyse von Sequenzierdaten wurde das Computerprogramm "*Sequencher*" (PC-Version 4.05, GeneCodes, USA) verwendet. Es erlaubt u. a. Korrekturlesen, Alignments und Restriktionsanalysen von Rohdaten. Außerdem wurde das Programm ClustalX (Jeanmougin et al., 1998) zur automatischen Erstellung von Alignments verwendet.

Über das Internet wurde auf folgende Programme und Dienste zugegriffen:

BlastX und BlastN	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST
ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP
CyanoBase	http://www.kazusa.or.jp:8080/cyano/index.html
Expasy	http://www.expasy.ch/
PSORT	http://psort.nibb.ac.jp:8800/
SOSUI	http://azusa.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/

Tmpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
Toppred	http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/

5.2 Methoden

5.2.1 Kulturbedingungen

5.2.1.1 Kulturbedingungen der Cryptophyte *Guillardia theta*

G. theta wurde bei 20 °C in einem 12-stündigen Licht/Dunkel-Rhythmus in f/2-Medium kultiviert. Dies erfolgte in 2-Liter Erlenmeyerkolben. Jeder Kolben enthielt 1 l Algenkultur, welche nach 2 Wochen geerntet wurden. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Algen in der späten log-Phase. Zur kontinuierlichen Kultur wurden 100 ml der zwei Wochen alten Stammkultur zu 900 ml frischem f/2-Medium gegeben.

5.2.1.2 Kulturbedingungen der Hefestämme AH-109 und Y-187

Die Kultur der gelieferten Hefestämme AH-109 und Y-187 erfolgte gemäß Protokoll der Firma Clontech.

5.2.1.3 Kulturbedingungen von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis Zellen wurden in BG-11 Medium, unter Dauerlicht (2000 lux), bei 30 °C und atmosphärischem CO₂ auf einem Orbitalschüttler kultiviert. Die Größe der Kolben variierte dabei von 20 ml bis 2 l.

5.2.2 Generelle molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1988).

5.2.2.1 Plasmidisololation aus *E.coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus den verwendeten *E.coli*-Stämmen wurde die Methode der alkalischen Lyase verwendet (Birnboim und Doly, 1979).

Einer Übernacht-Kultur von *E.coli* wurden 1,5 ml entnommen und bei 4 °C und 20 000 x g 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 150 µl Puffer P2. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Puffer P3 und 3 Tropfen Chloroform zugegeben und kurz kräftig gemischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 20 000 x g für 10 min zwecks Proteinfällung. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die DNA durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol bei 4 °C und 20 000 x g für 20 min gefällt. Nach einem Waschschriff mit 70 %igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O resuspendiert.

Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurde ein Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Puffer P1:	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	Na ₂ EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer P2:	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer P3:	KOAc, pH 5,5	3 M

5.2.2.2 Plasmidisololation aus Hefe

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe wurde eine modifizierte Form der Yeast boiling DNA Miniprep-Methode angewendet (Robzyk und Kassir, 1992). Aus einer Übernacht-Kultur wurden 1,5 ml entnommen und bei 4 °C und 20 000 x g 15 s zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem zweiten Aliquot der Kultur resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Danach erfolgte eine Resuspension in 100 µl STET-Puffer. Nach Zugabe von 200 mg Glas-

Beads (0,45 mm) folgte ein Vortexen des Ansatzes bei RT für 5 min. Unmittelbar danach wurden nochmals 100 µl STET-Puffer zugegeben und anschließend für 3 min bei 96 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 20 000 x g und 4 °C für 10 min. 120 µl des Überstands wurden in ein neues Cup überführt und mit 60 µl 7,5 M Ammoniumacetat 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach einer wiederholten Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 20 000 x g wurden erneut 120 µl des Überstands in ein neues Cup überführt und mit 240 µl eiskaltem 96 %igem Ethanol für mindestens 30 min bei -20 °C gefällt. Auf einen Waschschrift mit 70 %igem Ethanol folgte die Aufnahme des Pellets in 25 µl H₂O. Für eine Transformation von *E.coli* XL1-blue Zellen wurden 10 µl eingesetzt.

STET-Puffer:	Saccharose	8 %
	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	Na ₂ EDTA	50 mM
	Triton X-100	5 %

5.2.2.3 Transformation von *E. coli* XL1Blue MRF'

Die Transformation der Zellen erfolgte mit dem TransformAid™ Bacterial Transformation Kit nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, St. Leon-Roth).

5.2.2.4 Transformation von *E.coli* BL21 (DE3) Zellen

Die Transformation der *E.coli* BL-21 (DE3) Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene Europe, Amsterdam).

5.2.2.5 Transformation von *Synechocystis* sp PCC6803 Zellen

Bei der Transformation von *Synechocystis* Zellen macht man sich die natürliche Kompetenz dieses Cyanobakteriums zunutze Fremd-DNA aufzunehmen und durch homologe Rekombination in das eigene Genom zu integrieren. Hierbei kommt eine Abwandlung des Protokolls von Gregorieva zum Einsatz (Gregorieva und Shestakov, 1982).

Eine Kultur von *Synechocystis* in der logarithmischen Phase (OD₇₅₀ 0,8 - 1,0) wurde mit BG-11

Medium auf eine OD₇₅₀ von 0,1 verdünnt und bis zu einer OD₇₅₀ von 0,3 weiter kultiviert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 5000 x g. Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen BG-11 Medium auf eine OD₇₅₀ von 3,0 eingestellt. 300 µl dieser Zellsuspension wurden mit 10-20 µg zirkulärer oder linearisierter Plasmid-DNA bei 30 °C unter reduzierten Lichtbedingungen für 4 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Ausplattierung dieses Ansatzes auf BG-11 Agar Platten. Diese wurden unter reduzierten Lichtbedingungen und 30 °C für mehrere Tage inkubiert, bis ein gleichmäßiger grüner Bakterienrasen sichtbar war. Die Selektion erfolgte dann mit einem entsprechenden Antibiotikum, welches in 0,5 % Top-Agar verdünnt war und auf den Bakterienrasen aufgebracht wurde. Nach 7 bis 10 Tagen konnten die ersten Kolonien, welche sich vom hellgrünen Hintergrund abhoben, in selektives BG-11 Flüssigmedium überführt werden und der Selektionsdruck durch ständiges Erhöhen der Antibiotikakonzentration verstärkt werden. Putativ positive Kulturen wurden mittels PCR bzw. Southern-Blot Analysen auf das Vorhandensein der Antibiotika Resistenzkassette kontrolliert.

5.2.3 Nukleinsäureanalytik

5.2.3.1 RNA-Isolation aus *Guillardia theta* und *Synechocystis* sp. PCC6803

Die Isolation von Gesamt-RNA aus *G. theta* und *Synechocystis* erfolgte mit Hilfe TRIzol® gemäß den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe), incl. des optionalen Aufreinigungsschrittes.

5.2.3.2 Reverse Transkription

Reverse Transkription wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase der Firma Promega (Mannheim), nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.3.3 DNA-Isolation aus *Guillardia theta*

DNA-Isolation aus *G. theta* erfolgte anhand des CTAB-Protokolls (Doyle *et al.*, 1990). Ca. 750 ml einer Kultur wurden bei 1000 x g für 10 min pelletiert und anschließend einmal mit f/2 Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 800 µl CTAB in (2 % w/v) Puffer B resuspendiert. Die Lyase der Zellen erfolgte während eines Inkubationsschrittes bei 70 °C für 30 min. Der Zelldebris wurde durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 20 000 x g, RT)

pelletiert, der Überstand abgenommen und Proteine durch Zusatz von 1 Vol. PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v)) entfernt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 20 000 x g, 4 °C) konnte die obere wässrige Phase unter Vermeidung der Interphase abgenommen und anschließend nochmals mit 1 Vol. Chloroform gewaschen werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die obere Phase abdekantiert und die DNA präzipitiert. Das erhaltene DNA Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 25 µl ddH₂O aufgenommen.

Puffer B:	Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
	NaCl ₂	1,4 M
	Na ₂ EDTA	20 mM
	β-Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)

5.2.3.4 DNA-Isolation aus *Synechocystis* sp. PCC6803

3 ml einer Kultur wurden pelletiert und das Pellet in 400 µl TE-Puffer (pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 24 µl Syc-Break Medium, 200 µl Glasperlen und 400 µl Phenol wurden die Proben 3 x 10 s auf einem Vortexer geschüttelt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 20 000 x g. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Cup überführt und 2 x mit 1 Vol PCI gewaschen. Die Präzipitation der genomischen DNA erfolgte nach Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 4,8) und 0,7 Vol. Isopropanol (v/v) für 10 min bei 20 000 x g. Nach einem Waschschrift mit 400 µl 70 % Ethanol wurde das Pellet in 20 µl H₂O aufgenommen.

Sycy-Break Medium:	SDS	10 % (w/v)
	SLS	5 % (w/v)
TE-Puffer, pH 8,0:	Tris	10 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM

5.2.3.5 Herstellung DIG-markierter Sonden

Zur Herstellung DIG-markierter Sonden wurde der *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche, Mannheim) verwendet. Abweichend zum Protokoll des Herstellers wurde mit den Proben ein Standard-PCR Programm zur Generierung der Sonden durchgeführt.

5.2.3.6 Northern-Blot und Southern-Blot Analysen

Northern- und Southern-Blot Analysen wurden bis zum Hybridisierungsschritt gemäß Sambrook et al. durchgeführt. Signale wurden durch Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert.

5.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Enzyme und dazugehörigen Puffersysteme stammten von der Firma Eppendorf (Hamburg). PCR Bedingungen wie Annealingtemperaturen, Elongationszeiten und MgCl_2 -Konzentration wurden je nach Anforderung der Primer, der eingesetzten DNA und der Größe des erwarteten Amplifikats variiert.

Eine Standard PCR wurde in einem Endvolumen von 25 μl durchgeführt

MgCl_2	2-6 mM
Reaktionspuffer	1 x
Primer	je 0,25 μM
dNTPs	10 mM
Taq-Polymerase	1 U
Template	50 – 150 ng

PCR-Amplifikate wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (Konzentration 0,5 - 1,8 %) und aus diesem mit einem Skalpell ausgeschnitten.

5.2.3.8 Elution von PCR Fragmenten

Die Elution von PCR Fragmenten aus Agarose Gelen erfolgte durch den *JETsorb DNA extraction Kit* (GENOMED, Bad Oeynhausen) gemäß den Angaben des Herstellers.

5.2.3.9 Ligation von DNA Fragmenten

Nach erfolgreicher Elution wurden die entsprechenden DNA Fragmente in den T-Überhangsvektor pGEM-T (Promega, Mannheim) ligiert. Hierzu wurde einerseits die im pGEM-T-Kit mitgelieferte Ligase und der entsprechende Puffer verwendet, andererseits auf das T4 Ligase System der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Roth) zurück gegriffen. In beiden Fällen erfolgte die Ligationsreaktion nach Angaben des Herstellers.

Ligationen in alle anderen Vektoren erfolgten ausschließlich mit dem System der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Roth).

5.2.3.10 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mit dem *Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP Kit* (GE Healthcare, München) und Fluoreszenz gelabelten Oligonukleotiden (MWG, Ebersberg) durchgeführt.

Die Proben wurden anschließend auf einem LICOR 4200 Sequenzierautomaten aufgetrennt und analysiert. Für dieses System wurden IRD700- bzw. IRD800 markierte Sequenzierprimer verwendet. Pro 1000 bp zu sequenzierender DNA (einschließlich Plasmid) wurden 150 ng eingesetzt mit destilliertem Wasser auf 11 µl verdünnt und mit 1 µl IRD700-markiertem Sequenzierprimer (2 µM), 1 µl IRD800-markiertem Sequenzierprimer (4 µM) und 1 µl DMSO versetzt. Je 3 µl dieses Ansatzes wurden auf vier PCR-Gefäße verteilt, in denen je 1 µl der einzelnen Nucleotid-spezifischen Terminationslösungen vorgelegt waren. Die Reaktionslösungen wurden mit Öl überschichtet und 25 Zyklen aufeinanderfolgender Denaturierungs- (30 s), Annealings- (30 s) und Extensionsphasen (30 s) unterzogen. Nach der Sequenzierreaktion wurde jedem PCR-Gefäß 4 µl eines formamidhaltigen Ladepuffers (*formamide loading dye*, GE Healthcare, München) zugesetzt. Die Analyse der erstellten Sequenzierreaktionen erfolgte auf dem LICOR4200 Sequenzierautomaten mit Hilfe eines Acrylamid-Gels, basierend auf einer 40 %igen Rapid Gel XL Stocklösung (GE Healthcare, München).

Gelmatrix (LICOR4200):	Harnstoff	12,6 g
	Rapid Gel XL (40 %, GE Healthcare)	3,5 ml
	10 x TBE	3 ml
	APS (10 %)	210 µl
	TEMED	45 µl
	ddH ₂ O	add 18 ml

5.2.4 Proteinanalytik

5.2.4.1 Überexpression rekombinanter Proteine

Die Proteinexpression wurde mit dem Vektor pGEX-5X-3 (GE Healthcare, München) durchgeführt. Der Vektor kodiert für die Gluthation S-Transferase (GST), ein 26 kDa Protein. Da das zu untersuchende Protein direkt hinter den GST-Tag kloniert wurde, entstand bei der Transkription bzw. Translation ein Fusionsprotein, welches über GST detektiert werden konnte.

Die Expression fand in *E.coli* BL21 (DE3) (Stratagene, Heidelberg) Zellen statt. Die Transformation wurde gemäß Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe Kap. 5.2.2.4).

Für Expressionstests im kleinen Maßstab wurde aus einer Übernachtskultur (10 ml) transformierter BL21-Zellen 50 ml Kulturmedium 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde ein Aliquot von 1,5 ml entnommen und als nicht induzierte Referenz für die spätere SDS-PAGE aufbewahrt. Die restliche Kultur wurde mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei 37 °C 3 h geschüttelt. Im Anschluss wurde wieder ein 1,5 ml Aliquot entnommen und zusammen mit der nicht induzierten Referenz auf eine SDS-Page aufgetragen.

Zur Gewinnung von ausreichenden Mengen GST-Fusionsprotein wurden mit einer entsprechenden Vorkultur 500 ml bzw. 1 l Kulturmedium angeimpft. Analog dem oben beschriebenen Procedere wurden auch diese Kulturen mit IPTG induziert und bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Volumen durch diverse Zentrifugationsschritte eingengt und nach Zugabe von PIC (siehe Kap. 5.2.5) erfolgte ein Aufschluss der Zellen mit Hilfe einer *French Press*. Nach zwei Passagen bei 154 MPa konnte durch Ultrazentrifugation eine

Trennung der löslichen Proteine von Membranproteinen bzw. Zelltrümmern und unaufgeschlossenen Zellen erreicht werden. Der Überstand wurde direkt für Pull-down Experimente verwendet.

5.2.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine hier verwendete Methode zur Auftrennung von Proteinen ist die von Laemmli (Laemmli, 1970). Dabei wurden 0,25 mm und 1,5 mm dickes, diskontinuierliches Trenn- (pH 8,8) und Sammelgel (6,8) hergestellt (Mighty-Small-Apparatur, Höfer). Die Auftrennung der Proteine im Gel wurde durch den Acrylamidgehalt des Trenngels bestimmt und richtete sich nach der erforderlichen Trennleistung (Ausubel *et al.*, 1996). Als Standard wurde ein 12,5 %iges Trenngel verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1 x SDS-Laufpuffer bei 10 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel bei konstanter Spannung (120 V) durchgeführt.

Sammelgelpuffer, (4 x):	Tris-HCl, pH 6,8	500 mM
	SDS	0,4 % (w/v)
Trenngelpuffer, (4 x):	Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
SDS-Laufpuffer (10 x):	Tris	250 mM
	Glycin	2 M
	SDS	1 % (w/v)
SDS-Probenpuffer (2 x):	Glycerin	20 % (v/v)
	SDS 10 % (w/v)	20 % (v/v)
	Sammelgelpuffer	25 % (v/v)
	Bromphenolblau	25 µg/ml
	ddH ₂ O	30 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)

Zur besseren Auftrennung von Proteinen, die kleiner als 15 kDa sind, wurde das Tris-Tricine Gelsystem verwendet (Schagger und von Jagow, 1987). Der Acrylamidgehalt des Trenngels richtete sich analog der Tris-Glycerin Gele nach der erforderlichen Trennleistung.

Je nach Anforderung wurden in beiden Gel-Systemen Gradientengele unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration angefertigt. Diese wurden bei einer max. Spannung von 250 V gefahren.

Tricine Gelpuffer (3 x):	Tris-HCl, pH 8,45	3 M
	SDS	0,3 % (w/v)
	optional Glycerin (für Trenngele)	20 % (w/v)
Tricine Kathoden-Puffer (10 x):	Tris-HCl, pH 8,25	1 M
	Tricin	1 M
	SDS	1 % (w/v)
Tricine Anoden-Puffer (10 x):	Tris-HCl, pH 8,9	2 M

5.2.4.3 Nachweis von Proteinen mittels Coomassie Färbung

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit einer Coomassie Färbelösung sichtbar gemacht. Die Lösung wurde unmittelbar vor der Inkubation hergestellt. Nach einer Inkubation in der Färbelösung über Nacht wurden die Gele mit ddH₂O gewaschen.

Coomassie Färbelösung:	Methanol	20 % (v/v)
	Solution A	80 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue G250	5 % (w/v)
Solution A:	o-Phosphorsäure	2 % (v/v)
	Ammoniumsulfat	10 % (w/v)

5.2.4.4 Semidry-Westernblotting

Zum Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf PVDF-Membran (GE) wurde ein "Blot-Sandwich" blasenfrei zwischen die Elektroden positioniert. Hierzu wurden die Membran sowie die Whatman 3MM Papiere auf die entsprechende Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran musste vor dem Transfer 3 Sek. in Methanol und anschließend 15 min in H₂O inkubiert werden. Der Aufbau bestand aus drei, in Transferpuffer äquilibrierten, Whatman 3MM-Papieren, darauf die Transfermembran, das Gel und abschließend wiederum drei in Transferpuffer äquilibrierten Whatman 3MM-Papier. Die Transfermembran war dabei der Anodenseite zugewandt. Der Transfer erfolgte 1 h bei 0,8 mA/cm² Membran und maximal 50 V. Im Anschluss wurde die Membran getrocknet, in Folie eingeschlagen und kühl gelagert, oder mit Blockingreagenz behandelt (siehe Kap. 5.2.4.5)

Transfer-Puffer:	Tris-HCl pH 8,3 - 8,4	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol 98 %	20 %

5.2.4.5 Immundetektion von Proteinen

Die Detektion der immobilisierten Proteine wurde mit Hilfe des *Enhanced chemiluminescence-Kit* (ECL-Kit, Perbio, Rockford) durchgeführt. Gegen einen polyklonalen primären Antikörper war ein sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper gerichtet. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Blotmembran 1 h bei RT in Blockingreagenz inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 1 h Inkubationsschritt bei RT mit in Blockingreagenz verdünntem (Verdünnung 1:500 bis 1:2000) primären Antikörper. Hierauf wurde die Membran drei Mal 10 min in TBS-T gewaschen. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation bei RT mit in Blockingreagenz verdünntem (1:50 000) Sekundärantikörper an. Nach 3 x 10 min Waschen in TBS-T wurde zusätzlich 1 x in TBS und anschließend 1 x in ddH₂O je 5 min gewaschen. Für die ECL-Reaktion wurden die Lösungen ECL 1 und ECL 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und 0,125 ml/cm² auf die Proteinseite der Membran aufgebracht. Nach 5 min Inkubation bei RT

wurde die Flüssigkeit entfernt, die Membran in Frischhaltefolie verpackt und anschließend je nach Signalstärke 5 Sek bis 30 min ein Röntgenfilm aufgelegt.

TBS:	Tris-HCl, pH 7,5	150 mM
	NaCl ₂	0,9 % (w/v)
TBS-T:	Tris-HCl, 7,5	150 mM
	NaCl ₂	0,9 % (w/v)
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Blockingreagenz:	Magermilchpulver in TBS-T	7 % (w/v)

5.2.4.6 Chloroform-Methanol Fällung

Hierbei wurden 150 µl Proteinlösung mit 300 µl Methanol, 150 µl Chloroform und 350 µl H₂O versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 1 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Die Proteine setzen sich an der Phasengrenze ab. Nach Abnahme des Überstandes, ohne die Phasengrenze zu verletzen, wurde die restliche Lösung erneut mit 300 µl Methanol versetzt und für 2 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und im Anschluss in H₂O oder LysC Restriktions Puffer resuspendiert.

5.2.4.7 TCA Fällung

Proteinlösungen wurden mit einer 70 %igen TCA-Lösung auf 17 % Endkonzentration eingestellt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Lösung bei 4 °C und 20 000 x g für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bis zu fünf Mal mit 80 %igem Aceton gewaschen, um TCA zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend, je nach weiterer Verwendung, in entsprechendem Puffer aufgenommen.

5.2.5 Proteinisolation

Die Isolation von Proteinen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *G. theta* erfolgte auf unterschiedliche Art und Weise. Beide Methoden ergaben native Proteinextrakte.

5.2.5.1 Proteinisolation aus *Synechocystis* sp. PCC6803

Kolben mit entsprechenden Mengen an Kultur wurden bei 5000 x g (15 min, RT) pelletiert und 1 x in BG-11 Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen in max. 6 ml BG-11 Medium mit Protease-Inhibitor Cocktail (PIC) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch zwei Passagen mit der *French Press* bei 124 MPa. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen bzw. Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt (2000 x g, 15 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde entsprechend den weiteren Experimenten behandelt.

Zur Herstellung von Membranfraktion und löslicher Fraktion wurde der Überstand für 1 h bei 150 000 x g zentrifugiert. Der dadurch erhaltene Überstand setzte sich aus löslichen Proteinen zusammen. Das Pellet, die Membranfraktion, wurde 2 x mit NaCO₃ gewaschen, um Membran-assoziierte Proteine zu entfernen und konnte anschließend als reine Membranfraktion verwendet werden.

5.2.5.2 Proteinisolation aus *Guillardia theta*

G. theta Zellen wurden bei 3000 x g (15 min, RT) geerntet und 1 x mit f/2 Medium gewaschen. Das Pellet wurde in ca. 5 ml PBS mit PIC resuspendiert und durch eine 3 x 30 s (20-30 % Leistung) dauernde Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Analog dem Proteinaufschluss bei *Synechocystis* erfolgte ein Zentrifugationsschritt (2000 x g, 15 min, 4 °C) zwecks Entfernung von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen.

Protease Inhibitor Cocktail (PIC): Endkonzentration 1:200	Protease Inhibitor	Konzentration der Stammlösung	Anteil in 500 µl PIC
	Antipain	2 mg/ml	50 µl
	Chymostatin	5 mg/ml	20 µl
	Aprotinin	2 mg/ml	50 µl

	Trypsin-Inhibitor	5 mg/ml	20 µl
	Na ₂ -EDTA	2 mg/ml	50 µl
	Pepstatin	2 mg/ml	50 µl
	Leupeptin	5 mg/ml	20 µl
	Elastatinal	1 mg/ml	100 µl

Mit 10 mM HEPES-KOH, pH 7,0 auf 500 µl auffüllen

5.2.6 Isolation intakter PBS aus *Synechocystis* sp. PCC6803

Um PBS und ihre Untereinheiten ausreichend analysieren zu können, wurden intakte PBS sowohl aus *Synechocystis* Wt wie auch aus Δ slr1649 Zellen isoliert. Hierbei wurden je 1 l Zellen bei 5000 x g zentrifugiert, ein Mal mit BG11-Medium gewaschen und in 0,75 M Kalium-Phosphat Puffer (KPP) pH 7,0 resuspendiert. Nach Zugabe von PIC wurden die Zellen durch zwei Passagen in einer French Press bei 124 MPa aufgeschlossen. Anschließend wurde dem Zell-Lysat Triton-X-100 (Endkonzentration 2 %) zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Der folgende Zentrifugationsschritt wurde bei 48 000 x g durchgeführt. Der Überstand wurde auf einen Sucrose-Gradienten (10-60 % in KPP) geladen und für 17 h bei 15 °C mit 17 000 rpm zentrifugiert. Im Gradienten sind die intakten PBS als deutliche blaue Bande zu erkennen. Diese können nach Entfernen aus dem Gradienten für mehrere Wochen im Dunkeln bei 16 °C aufbewahrt werden.

5.2.7 Elektronenmikroskopie

Synechocystis Zellen wurden abzentrifugiert und in 1 % Glutaraldehyd für 4 h fixiert. Nach einigen Waschschritten erfolgte eine Entwässerung der Zellen durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30 % - Ethanol abs.). Anschließend wurden sie in Lowicryl eingebettet und die Polymerisation für 48 h bei 4 °C unter UV-Licht durchgeführt. Von diesen Blöcken wurden mit Hilfe eines Glasmessers Ultradünnschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden einem

Inkubationsschritt mit dem Primärantikörper α -1649 (Konz. 1:400) unterzogen. Nach einem weiteren Inkubationsschritt mit einem an Goldpartikel (30 nm) gekoppelten Sekundärantikörper (Konz. 1:140) konnten die Proben am Elektronenmikroskop analysiert werden.

5.2.8 Protein-Interaktions Assays

5.2.8.1 Yeast-Two-Hybrid

Hier wurde das Yeast-Two-Hybrid System der Firma Clontech verwendet. Yeast-Two-Hybrid Experimente wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei speziell das *Small-Scale* Yeast Mating Protokoll zum Einsatz kam. Klonierungsarbeiten erfolgten in die entsprechenden Hefe-Vektoren pGADT7 (prey) und pGBKT7 (bait).

5.2.8.2 GST-Pull-down

Für GST-Pull-down Experimente wurden 1 l mit pGex-Slr1649 transformierte *E.coli* BL-21-Zellen entsprechend Kap. 5.2.4.1 überexprimiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach Ernten der Zellen bei 8000 x g für 10 min wurden diese in einem geeigneten Volumen TEN100 Puffer, 1:200 mit PIC versetzt, resuspendiert und mit zwei Passagen durch eine *French Press* bei 124 MPa aufgeschlossen. Eine anschließende Zentrifugation bei 20 000 x g, gefolgt von einer Ultrazentrifugation bei 100 000 x g des ersten Überstandes, trennte Membranproteine bzw. *inclusion bodies* und Zelltrümmer von den löslichen Proteinen mit dem GST-Fusionsprotein. Letztere wurden abgenommen und direkt für Pull-down Experimente verwendet. Hierzu wurden 200 μ l *Glutathione Sepharose*TM 4B *fast flow beads* 3 x mit TEN100 Puffer gewaschen. Die Beads wurden danach mit 3 ml Proteinextrakts aus *E.coli* bei 4 °C für 1 h auf einem Taumelschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads 3 x mit TEN100 gewaschen und danach mit *Synechocystis* Proteinextrakt bei 4 °C für 1 h auf einem Taumelschüttler inkubiert. Diese Inkubation wurde unterschiedlich, bis zu 24 h bei 4 °C durchgeführt werden. Um nicht gebundene Proteine wie auch unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde der Ansatz mehrmals mit NETN300 Puffer gewaschen. Hierbei empfiehlt es sich, die NaCl Konzentration zu variieren (je höher die Konzentration, desto stringenter kann gewaschen werden). Die Elution des GST-Fusionsproteins und seiner putativen Bindungspartner erfolgte durch Kochen in SDS-

Ladepuffer. Anschließend erfolgte die Auftrennung durch SDS-PAGE. Analog zu jedem Fusionsprotein wurde als Kontrolle auch nicht fusioniertes GST an die Beads gekoppelt und entsprechend behandelt.

TEN:	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	Na ₂ EDTA	0,1 mM
	NaCl ₂	100 mM
NETN:	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	Na ₂ EDTA	0,1 mM
	NaCl ₂	300-800 mM
	NP-40	0,5 % (v/v)

5.2.9 Pigmentanalysen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zellen

5.2.9.1 Chlorophyll Konzentrationsbestimmung

Der Chlorophyllgehalt wurde in Anlehnung an die Methode von Arnon (Arnon, 1949) durchgeführt. Hierbei wurde 1 ml Zellsuspension bei 10 000 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 90 % (v/v) Methanol resuspendiert. Nach einer Inkubation für 1 h bei -20 °C erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Der Chlorophyll a-Gehalt wurde durch Messung der Absorption bei 652 nm und 665 nm nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Chlorophyll a (mg/ml)} = 16,82 \times A_{665} - 9,28 \times A_{652}$$

5.2.9.2 Phycocyanin Konzentrationsbestimmung

Der Phycocyanin-Gehalt wurde in Anlehnung an die Methode von Grossman durchgeführt (Grossman *et al.*, 1993). 1 ml Zellsuspension wurde für 10 min bei 75 °C inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsbestimmung bei 620 nm und 750 nm.

$$\text{Phycocyanin (mg/ml)} = (A_{620} - A_{750} \text{ (nicht erhitzt)}) - (A_{620} - A_{750} \text{ (erhitzt)})$$

5.2.10 Proteolytische Assays

Proteolytische Assays wurden einerseits mit der Endoprotease LysC und andererseits mit Ameisensäure durchgeführt.

LysC wurde entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt, wobei sich ein Verdau ü.N. in einem 1:100 Verhältnis von Protease zu Protein (w/w) als ausreichend herausstellte.

Im Falle von Ameisensäure wurden präzipitierte Proteine in 100 % Ameisensäure resuspendiert und die Lösung anschließend mit dH₂O auf 70 % Ameisensäure eingestellt. Die Ansätze wurden ü.N. inkubiert und anschließend getrocknet. Das resultierende Pellet wurde in LysC-Puffer gelöst und nochmals mit 80 % Aceton gewaschen.

In beiden Fällen wurden die Ansätze abschließend in SDS Ladepuffer aufgenommen und per SDS-PAGE analysiert.

LysC Puffer (Roche):	Tris-HCl, pH 8,5	25 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM
	SDS	0,1 %

6 LITERATUR

- Adir, N. (2005) Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynth Res* **85**: 15-32.
- Ajlani, G., Vernotte, C., DiMagno, L., and Haselkorn, R. (1995) Phycobilisome core mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1231**: 189-196.
- Anderson, L.K., Rayner, M.C., and Eiserling, F.A. (1987) Mutations that affect structure and assembly of light-harvesting proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6701. *J Bacteriol* **169**: 102-109.
- Apt, K.E., Collier, J.L., and Grossman, A.R. (1995) Evolution of the phycobiliproteins. *J Mol Biol* **248**: 79-96.
- Arciero, D.M., Dallas, J.L., and Glazer, A.N. (1988a) In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. II. Determination of the structures of tryptic bilin peptides derived from the phycocyanobilin adduct. *J Biol Chem* **263**: 18350-18357.
- Arciero, D.M., Dallas, J.L., and Glazer, A.N. (1988b) In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. III. Properties of the phycoerythrobilin adduct. *J Biol Chem* **263**: 18358-18363.
- Arnon, D.I. (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15.
- Asano, T., Yoshioka, Y., Kurei, S., Sakamoto, W., and Machida, Y. (2004) A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in *Arabidopsis*. *Plant J* **38**: 448-459.
- Ausubel, L.J., Kwan, C.K., Sette, A., Kuchroo, V., and Hafler, D.A. (1996) Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15317-15322.
- Bennett, A., and Bogorad, L. (1971) Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. *Biochemistry* **10**: 3625-3634.
- Berns, D.S., and Edwards, M.R. (1965) Electron micrographic investigations of C-phycocyanin. *Arch Biochem Biophys* **110**: 511-516.
- Beuhler, R.J., Pierce, R.C., Friedman, L., and Siegelman, H.W. (1976) Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. *J Biol Chem* **251**: 2405-2411.
- Bhattacharya, D., and Medlin, L. (1995) The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J Phycol* **31**: 489-498.
- Binder, A., Wilson, K., and Zuber, H. (1972) C-phycocyanin from the thermophilic blue-green alga *Mastigocladus laminosus*, isolation, characterization and subunit composition. *FEBS Lett* **20**: 111-116.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bolter, B., Soll, J., Schulz, A., Hinnah, S., and Wagner, R. (1998) Origin of a chloroplast protein importer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15831-15836.
- Bryant, D.A., Glazer, A.N., and Eiserling, F.A. (1976) Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Arch Microbiol* **110**: 61-75.

- Bryant, D.A., Guglielmi, G., Tandeau de Marsac, N., Castets, A.M., and Cohen-bazire, G. (1979) The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch Microbiol* **123**: 113-127.
- Cavalier-Smith, T. (1995) Zooflagellate phylogeny and classification. *Tsitologiia* **37**: 1010-1029.
- Cavalier-Smith, T. (2001) Obcells as proto-organisms: membrane heredity, lithophosphorylation, and the origins of the genetic code, the first cells, and photosynthesis. *J Mol Evol* **53**: 555-595.
- Cavalier-Smith, T. (2002) Nucleomorphs: enslaved algal nuclei. *Curr Opin Microbiol* **5**: 612-619.
- Chen, F., and Lu, J. (2002) Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: a new insight on lytic and lysogenic phages. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2589-2594.
- Chun, E.H.L., Vaughn, M.H., and Rich, A. (1963) The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. *J. Molec. Biol.* **7**.
- Clokic, M.R., Shan, J., Bailey, S., Jia, Y., Krisch, H.M., West, S., and Mann, N.H. (2006) Transcription of a 'photosynthetic' T4-type phage during infection of a marine cyanobacterium. *Environ Microbiol* **8**: 827-835.
- Cobley, J.G., Clark, A.C., Weerasurya, S., Queseda, F.A., Xiao, J.Y., Bandrapali, N., D'Silva, I., Thounaojam, M., Oda, J.F., Sumiyoshi, T., and Chu, M.H. (2002) CpeR is an activator required for expression of the phycoerythrin operon (cpeBA) in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* and is encoded in the phycoerythrin linker-polypeptide operon (cpeCDEST). *Molecular Microbiology* **44**: 1517-1531.
- Collier, J.L., and Grossman, A.R. (1994) A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *Embo J* **13**: 1039-1047.
- Crespi, H.L., and Smith, U.H. (1970) The chromophore-protein bonds in phycocyanin. *Phytochemistry* **9**: 205.
- de Lorimier, R., Bryant, D.A., and Stevens, S.E., Jr. (1990a) Genetic analysis of a 9 kDa phycocyanin-associated linker polypeptide. *Biochim Biophys Acta* **1019**: 29-41.
- de Lorimier, R., Guglielmi, G., Bryant, D.A., and Stevens, S.E., Jr. (1990b) Structure and mutation of a gene encoding a Mr 33,000 phycocyanin-associated linker polypeptide. *Arch Microbiol* **153**: 541-549.
- De Marais, D.J. (2000) Evolution. When did photosynthesis emerge on Earth? *Science* **289**: 1703-1705.
- de Marsac, N.T., and Cohen-Bazire, G. (1977) Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 1635-1639.
- Deane, J.A., Fraunholz, M., Su, V., Maier, U.G., Martin, W., Durnford, D.G., and McFadden, G.I. (2000) Evidence for nucleomorph to host nucleus gene transfer: light-harvesting complex proteins from cryptomonads and chlorarachniophytes. *Protist* **151**: 239-252.
- Debreczeny, M.P., Sauer, K., Zhou, J.H., and Bryant, D.A. (1993) Monomeric C-phycocyanin at room temperature and 77 K: resolution of the absorption and fluorescence spectra of the individual chromophores and the energy-transfer rate constants. *J Phys Chem* **97**: 9852-9862.
- Dodge, J.D. (1969) The ultrastructure of *Chroomonas mesostigmatica* Butcher (Cryptophyceae). *Arch. Microbiol.* **69**: 266.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L.T., Wu, X., Reith, M., Cavalier-Smith, T., and Maier, U.G. (2001) The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* **410**: 1091-1096.

- Douglas, S.E., and Gray, M.W. (1991) Plastid origins. *Nature* **352**: 290.
- Douglas, S.E., Murphy, C.A., Spencer, D.F., and Gray, M.W. (1991) Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* **350**: 148-151.
- Douglas, S.E. (1992) A secY homologue is found in the plastid genome of *Cryptomonas phi*. *FEBS Lett* **298**: 93-96.
- Douglas, S.E., and Penny, S.L. (1999) The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta* : complete sequence and conserved syntenic groups confirm its common ancestry with red algae. *J. Mol. Evol.* **48**: 236-244.
- Doyle, C., Ford, P.J., Ponath, P.D., Spies, T., and Strominger, J.L. (1990) Regulation of the class II-associated invariant chain gene in normal and mutant B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4590-4594.
- Ducet, A., Sidler, W., Wehrli, E., Frank, G., and Zuber, H. (1996) Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidiscoidal phycobilisome type from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Eur J Biochem* **236**: 1010-1024.
- Ducet, A., Müller, S.A., Goldie, K.N., Hefti, A., Sidler, W.A., Zuber, H., and Engel, A. (1998) Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 71201. *J Mol Biol* **278**: 369-388.
- Duysens, L.N. (1951) Transfer of light energy within the pigment systems present in photosynthesizing cells. *Nature* **168**: 548-550.
- Edwards, M.R., and Gantt, E. (1971) Phycobilisomes of the thermophilic blue-green alga *Synechococcus lividus*. *J Cell Biol* **50**: 896-900.
- Elmorjani, K., Thomas, J.-C., and Sebban, P. (1986) Phycobilisomes of wild type and pigment mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Arch Microbiol* **146**: 186-191.
- Eschbach, S., Hofmann, C.J., Maier, U.G., Sitte, P., and Hansmann, P. (1991) A eukaryotic genome of 660 kb: electrophoretic karyotype of nucleomorph and cell nucleus of the cryptomonad alga, *Pyrenomonas salina*. *Nucleic Acids Res* **19**: 1779-1781.
- Esenbeck, N. (1836) Ueber einen blau-rothen Farbstoff, der sich bei der Zersetzung von Oscillatorien bildet. *Liebigs Ann Chem* **17**: 75-82.
- Fairchild, C.D., Zhao, J., Zhou, J., Colson, S.E., Bryant, D.A., and Glazer, A.N. (1992) Phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7017-7021.
- Fillat, M.F., Flores, E., and Gomez-Moreno, C. (1993) Homology of the N-terminal domain of the petH gene product from *Anabaena* sp. PCC 7119 to the CpcD phycobilisome linker polypeptide. *Plant Mol Biol* **22**: 725-729.
- Fraunholz, M.J., Wastl, J., Zauner, S., Rensing, S.A., Scherzinger, M.M., and Maier, U.-G. (1997) The evolution of cryptophytes. *Plant Syst. Evol.* **11 [Suppl.]**: 163-174.
- French, C.S., and Young, V.K. (1952) The fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll. *J Gen Physiol* **35**: 873-890.
- Füglister, P., Rübli, R., Suter, F., and Zuber, H. (1984) Minor polypeptides from the phycobilisome of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. Isolation, characterization and amino acid sequences of a colourless 8,9 kDa polypeptide and of a 16.2 kDa phycobiliprotein. *Physiol. Chem* **365**: 1085-1096.

- Gantt, E., and Conti, S.F. (1965) The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J Cell Biol* **26**: 365-381.
- Gantt, E., and Conti, S.F. (1966a) Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. *J Cell Biol* **29**: 423-434.
- Gantt, E., and Conti, S.F. (1966b) Phycobiliprotein localization in algae. *Brookhaven Symp Biol* **19**: 393-405.
- Gantt, E., Edwards, M.R., and Provasoli, L. (1971) Chloroplast structure of the Cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. *J Cell Biol* **48**: 280-290.
- Gantt, E., and Lipschultz, C.A. (1974) Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*: pigment analysis. *Biochemistry* **13**: 2960-2966.
- Gibbs, S.P. (1978) The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can J Bot* **56**: 2883-2889.
- Gibbs, S.P. (1979) The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. *J Cell Sci* **35**: 253-266.
- Gillot, M.A., and Gibbs, S.P. (1980) The cryptomonad nucleomorph: its ultrastructure and evolutionary significance. *J. Phycol.* **16**: 558-568.
- Gilson, P., and McFadden, G.I. (1995) The chlorarachniophyte: a cell with two different nuclei and two different telomeres. *Chromosoma* **103**: 635-641.
- Gilson, P.R., and McFadden, G.I. (1996) The miniaturized nuclear genome of eukaryotic endosymbiont contains genes that overlap, genes that are cotranscribed, and the smallest known spliceosomal introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7737-7742.
- Gilson, P.R., and McFadden, G.I. (1997) Good things in small packages: the tiny genomes of chlorarachniophyte endosymbionts. *Bioessays* **19**: 167-173.
- Gilson, P.R., Su, V., Slamovits, C.H., Reith, M.E., Keeling, P.J., and McFadden, G.I. (2006) Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9566-9571.
- Glauner, B., Holtje, J.V., and Schwarz, U. (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 10088-10095.
- Glauser, M., Stirewalt, V.L., Bryant, D.A., Sidler, W., and Zuber, H. (1992) Structure of the genes encoding the rod-core linker polypeptides of *Mastigocladus laminosus* phycobilisomes and functional aspects of the phycobiliprotein/linker-polypeptide interactions. *Eur J Biochem* **205**: 927-937.
- Glazer, A.N., and Apell, G.S. (1977) A common evolutionary origin for the biliproteins of cyanobacteria, rhodophytes and cryptophyta. *Federation of European Microbiology Society Letters* **1**: 113-116.
- Glazer, A.N., Williams, R.C., Yamanaka, G., and Schachman, H.K. (1979) Characterization of cyanobacterial phycobilisomes in zwitterionic detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 6162-6166.
- Glazer, A.N. (1983) Comparative biochemistry of photosynthetic light-harvesting systems. *Annu Rev Biochem* **52**: 125-157.
- Glazer, A.N. (1985) Light harvesting by phycobilisomes. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **14**: 47-77.
- Glazer, A.N. (1988) Phycobiliproteins. *Methods Enzymol* **167**: 291-303.

- Glazer, A.N., and Wedemayer, G.J. (1995) Cryptomonad biliproteins — an evolutionary perspective. *Photosynth Res* **46**: 93-105.
- Golden, J.W., and Yoon, H.S. (1998) Heterocyst formation in *Anabaena*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 623-629.
- Gould, S.B., Sommer, M.S., Hadfi, K., Zauner, S., Kroth, P.G., and Maier, U.G. (2006a) Protein Targeting into the Complex Plastid of Cryptophytes. *J Mol Evol*.
- Gould, S.B., Sommer, M.S., Kroth, P.G., Gile, G.H., Keeling, P.J., and Maier, U.G. (2006b) Nucleus-to-nucleus Gene Transfer and Protein Retargeting into a Remnant Cytoplasm of Cryptophytes and Diatoms. *Mol Biol Evol*.
- Gray, M. (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* **141**: 233–357.
- Greenwood, A.D. (1974) The Cryptophyta in relation to phylogeny and photosynthesis. in *Electron microscopy*. *Electron microscopy*: 566-567.
- Greenwood, A.D., Griffiths, H.B., and Santore, U.J. (1977) Chloroplasts and cell compartments in Cryptophyceae. *Br. phycol. Bull, ia* **119**.
- Gregorieva, G.A., and Shestakov, S.V. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Lett*: 367–370.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., and Collier, J.L. (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**: 725-749.
- Guard-Friar, D., and MacColl, R. (1986) Subunit separation (α , α' , β) of cryptomonad biliproteins. *Photochem Photobiol* **43**: 81-85.
- Guillard, R.R., and Ryther, J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* **8**: 229-239.
- Guillard, R.R. (1975) Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*: 29-60.
- Hayes, S.A., and Dice, J.F. (1996) Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* **132**: 255-258.
- Hedges, S.B., Blair, J.E., Venturi, M.L., and Shoe, J.L. (2004) A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol* **4**: 2.
- Hill, D.R.A., and Rowan, K.S. (1989) The biliproteins of the Cryptophyceae. *Phycologia* **28**: 455-463.
- Hofmann, C.J., Rensing, S.A., Hauber, M.M., Martin, W.F., Muller, S.B., Couch, J., McFadden, G.I., Igloi, G.L., and Maier, U.G. (1994) The smallest known eukaryotic genomes encode a protein gene: towards an understanding of nucleomorph functions. *Mol Gen Genet* **243**: 600-604.
- Hu, I.C., Lee, T.R., Lin, H.F., Chiueh, C.C., and Lyu, P.C. (2006) Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin α -subunits by autocatalytic bilin attachment. *Biochemistry* **45**: 7092-7099.
- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gartner, W., Wilde, A., and Borner, T. (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**: 663.
- Jenkins, J., Hiller, R.G., Speirs, J., and Godovac-Zimmermann, J. (1990) A genomic clone encoding a cryptophyte phycoerythrin α -subunit. Evidence for three α -subunits and an N-terminal membrane transit sequence. *FEBS Lett* **273**: 191-194.

- Jung, L.J., Chan, C.F., and Glazer, A.N. (1995) Candidate genes for the phycoerythrocyanin alpha subunit lyase. Biochemical analysis of pecE and pecF interposon mutants. *J Biol Chem* **270**: 12877-12884.
- Jurgens, U.J., Drews, G., and Weckesser, J. (1983) Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J Bacteriol* **154**: 471-478.
- Kahn, K., Mazel, D., Houmard, J., Tandeau de Marsac, N., and Schaefer, M.R. (1997) A role for cpeYZ in cyanobacterial phycoerythrin biosynthesis. *J Bacteriol* **179**: 998-1006.
- Kandror, O., Busconi, L., Sherman, M., and Goldberg, A.L. (1994) Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *J Biol Chem* **269**: 23575-23582.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* **3**: 185-209.
- Kawach, O., Voss, C., Wolff, J., Hadfi, K., Maier, U.G., and Zauner, S. (2005) Unique tRNA introns of an enslaved algal cell. *Mol Biol Evol* **22**: 1694-1701.
- Keeling, P.J., Deane, J.A., Hink-Schauer, C., Douglas, S.E., Maier, U.G., and McFadden, G.I. (1999) The secondary endosymbiont of the cryptomonad *Guillardia theta* contains alpha-, beta-, and gamma-tubulin genes. *Mol Biol Evol* **16**: 1308-1313.
- Kessel, M., MacColl, R., Berns, D.S., and Edwards, M.R. (1973) Electron microscope and physical chemical characterization of C-phycoerythrin from fresh extracts of two blue-green algae. *Can J Microbiol* **19**: 831-836.
- Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., and Roos, D.S. (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **275**: 1485-1489.
- Koller, K.P., Wehrmeyer, W., and Schneider, H. (1977) Isolation and characterization of disc-shaped phycobilisomes from the red alga *Rhodella violacea*. *Arch Microbiol* **112**: 61-67.
- Kondo, K., Geng, X.X., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2005) Distinct roles of CpcG1 and CpcG2 in phycobilisome assembly in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res* **84**: 269-273.
- Köst-Reyes, E., Köst, H.P., and Rüdiger, W. (1975) Bonding between chromophore and protein in biliproteins. Detection of Cysteine as binding amino acid in B-phycoerythrin. *Liebigs Ann. Chem.* **1975**: 1594.
- Kützing, F.T. (1843) *Phycologia generalis, oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange*. *FA Brockhaus, Leipzig*.
- Kylin, H. (1910) Über Phycoerythrin und Phycocyan bei *Ceramium rubrum*. *Ag. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **169**-239.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagarias, J.C., Glazer, A.N., and Rapoport, H. (1979) Chromopeptides from C-phycoerythrin. Structure and linkage of a phycocyanobilin bound to the beta-subunit. *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 5030.

- Lamparter, T., Mittmann, F., Gartner, W., Borner, T., Hartmann, E., and Hughes, J. (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11792-11797.
- Lange, W., Schatz, G.H., Wilhelm, C., and Mörschel, E. (1990a) The supramolecular structure of the light-harvesting system of cyanobacteria and red algae. *Baltseffsky M (ed) Current Research in Photosynthesis* **2**: 105-108.
- Lange, W., Wilhelm, C., Wehrmeyer, W., and Mörschel, E. (1990b) The supramolecular structure of Photosystem 2 - phycobilisome - complexes of *Porphyridium Cruentum*. *Bot Acta* **103**: 250-257.
- Lefort, M. (1965) Sur le chromatoplasma d'une cyanophyce endosymbiotique : *Glaucozystis nostochinearum*. *Compt. rend. Acad. Sc.* **261**: 223.
- Lemberg, R. (1930) Chromoproteide der Rotalgen. II. Spaltung mit pepsin und Säuren. Isolierung eines Pyrrolfarbstoffs. *Liebigs Ann Chem* **477**: 195-245.
- Li, H., and Sherman, L.A. (2002) Characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *delta*tanB mutants under nitrogen-deficient conditions. *Arch Microbiol* **178**: 256-266.
- Liaud, M.F., Brandt, U., Scherzinger, M., and Cerff, R. (1997) Evolutionary origin of cryptomonad microalgae: two novel chloroplast/cytosol-specific GAPDH genes as potential markers of ancestral endosymbiont and host cell components. *J Mol Evol* **44 Suppl 1**: S28-37.
- Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R., and Pakrasi, H.B. (2006) Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma* **227**: 129-138.
- Liu, L.N., Chen, X.L., Zhang, Y.Z., and Zhou, B.C. (2005) Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1708**: 133-142.
- Lundell, D.J., Williams, R.C., and Glazer, A.N. (1981) Molecular architecture of a light-harvesting antenna. In vitro assembly of the rod substructures of *Synechococcus* 6301 phycobilisomes. *J Biol Chem* **256**: 3580-3592.
- MacColl, R., Habig, W., and Berns, D.S. (1973) Characterization of phycocyanin from *Chromonas* species. *J Biol Chem* **248**: 7080-7086.
- MacColl, R., and Guard-Friar, D. (1987) Phycobiliproteins. *CRC Press*.
- MacColl, R. (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol* **124**: 311-334.
- MacColl, R. (2004) Allophycocyanin and energy transfer. *Biochim Biophys Acta* **1657**: 73-81.
- Maier, U.G., Hofmann, C.J., Eschbach, S., Wolters, J., and Igloi, G.L. (1991) Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol Gen Genet* **230**: 155-160.
- Maier, U.G., Douglas, S.E., and Cavalier-Smith, T. (2000) The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. *Protist* **151**: 103-109.
- Mann, N.H., Clokie, M.R., Millard, A., Cook, A., Wilson, W.H., Wheatley, P.J., Letarov, A., and Krisch, H.M. (2005) The genome of S-PM2, a "photosynthetic" T4-type bacteriophage that infects marine *Synechococcus* strains. *J Bacteriol* **187**: 3188-3200.
- Margulis, L. (1970) Origin of eucaryotic cells. *New Haven: Yale University Press*.

- Martin, W., and Herrmann, R.G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**: 9-17.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., and Kowallik, K.V. (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-165.
- McFadden, G.I., Reith, M.E., Munholland, J., and Lang-Unnasch, N. (1996) Plastid in human parasites. *Nature* **381**: 482.
- Mereschkowsky, C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Zentralbl.* **25**: 593-604.
- Mereschkowsky, C. (1910) Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol. Zentralbl.* **30**: 278-367.
- Mimuro, M., Fuglistaller, P., Rumbeli, R., and Zuber, H. (1986) Functional assignment of chromophores and energy transfer in C phycocyanin isolated from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Biochim Biophys Acta* **848**: 155-166.
- Morschel, E., and Wehrmeyer, W. (1975) Cryptomonad biliprotein: phycocyanin-645 from a *Chroomonas* species. *Arch Microbiol* **105**: 153-158.
- Muckle, G., Otto, J., and Rudiger, W. (1978) On the linkages between chromophore and protein in biliproteins, VII. Amino acid sequence in the chromophore regions of C-phycocerythrin from *Pseudanabaena* W 1173 and *Phormidium persicinum*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **359**: 345-355.
- Mullineaux, C.W. (1992) Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium. *Biochim Biophys Acta* **1100**: 285-292.
- Mullineaux, C.W. (1994) Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1184**: 71-77.
- Nakajima, M., Sakamoto, T., and Wada, K. (2002) The complete purification and characterization of three forms of ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase from a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Plant Cell Physiol* **43**: 484-493.
- Newman, B.J., and Gray, J.C. (1988) Characterization of a full-length cDNA clone for pea ferredoxin-NADP reductase. *Plant Mol Biol* **10**: 511-520.
- Nitschke, W., Mühlenhoff, U., and Liebl, U. (1998) Evolution. *Raghavendra A (ed) Photosynthesis: a Comprehensive Treatise*: 285-304.
- O'Heocha, C., and Raftery, M. (1959) Phycoerythrins and phycocyanins of cryptomonads. *Nature* **184**: 1049-1051.
- Ong, L.J., and Glazer, A.N. (1987) R-phycocyanin II, a new phycocyanin occurring in marine *Synechococcus* species. Identification of the terminal energy acceptor bilin in phycocyanins. *J Biol Chem* **262**: 6323-6327.
- Palmer, J.D. (2003) The symbiotic birth and spread of plastids: How many times and whodunit? *Journal of Phycology* **39**: 4-12.
- Pastore, A., and Lesk, A.M. (1990) Comparison of the structures of globins and phycocyanins: evidence for evolutionary relationship. *Proteins* **8**: 133-155.
- Plank, T., and Anderson, L.K. (1995) Heterologous assembly and rescue of stranded phycocyanin subunits by expression of a foreign *cpcBA* operon in *Synechocystis* sp. strain 6803. *J Bacteriol* **177**: 6804-6809.

- Plank, T., Toole, C., and Anderson, L.K. (1995) Subunit interactions and protein stability in the cyanobacterial light-harvesting proteins. *J Bacteriol* **177**: 6798-6803.
- Pschorn, R., Rühle, W., and Wild, A. (1988) Structure and function of ferredoxin NADP oxidoreductase. *Photosynth Res* **17**: 217-229.
- Reumann, S., Davila-Aponte, J., and Keegstra, K. (1999) The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 784-789.
- Reumann, S., and Keegstra, K. (1999) The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes. *Trends Plant Sci* **4**: 302-307.
- Reuter, W., Westermann, M., Brass, S., Ernst, A., Boger, P., and Wehrmeyer, W. (1994) Structure, composition, and assembly of paracrystalline phycobiliproteins in *Synechocystis* sp. strain BO 8402 and of phycobilisomes in the derivative strain BO 9201. *J Bacteriol* **176**: 896-904.
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A., and Thomas, J.C. (2001) Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol* **183**: 2989-2994.
- Rippka, R., Waterbury, J., and G., C.-B. (1974) A Cyanobacterium Which Lacks Thylakoids. *Arch. Microbiol.* **100**: 419-436.
- Ris, H., and Plaut, W. (1962) Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* **13**: 383-391.
- Robzyk, K., and Kassir, Y. (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**: 3790.
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W.R., Johnson, Z.I., Land, M., Lindell, D., Post, A.F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S.L., Steglich, C., Sullivan, M.B., Ting, C.S., Tolonen, A., Webb, E.A., Zinser, E.R., and Chisholm, S.W. (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**: 1042-1047.
- Rosinski, J., Hainfeld, J.F., Rigbi, M., and Siegelman, H.W. (1981) Phycobilisome Ultrastructure and Chromatic Adaptation in *Fremyella diplosiphon*. *Annals of Botany* **47**: 1-12.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1988) Molecular Cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sarcina, M., Tobin, M.J., and Mullineaux, C.W. (2001) Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942. Effects of phycobilisome size, temperature, and membrane lipid composition. *J Biol Chem* **276**: 46830-46834.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379.
- Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W., and Zuber, H. (1985) X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures. *J Mol Biol* **184**: 257-277.
- Schluchter, W.M., and Bryant, D.A. (1992) Molecular characterization of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in cyanobacteria: cloning and sequence of the *petH* gene of *Synechococcus* sp. PCC 7002 and studies on the gene product. *Biochemistry* **31**: 3092-3102.

- Schoenleber, R.W., Lundell, D.J., Glazer, A.N., and Rapoport, H. (1984) Bilin attachment sites in the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin. Structural studies on the singly linked phycoerythrobilins. *J Biol Chem* **259**: 5485-5489.
- Schopf, J.W. (1993) Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**: 640-646.
- Schramm, B.L., and Kroes, H.H. (1971) Structure of Phycocyanobilin. *Eur J Biochem* **19**: 581-594.
- Serre, L., Vellieux, F.M., Medina, M., Gomez-Moreno, C., Fontecilla-Camps, J.C., and Frey, M. (1996) X-ray structure of the ferredoxin:NADP⁺ reductase from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 at 1.8 Å resolution, and crystallographic studies of NADP⁺ binding at 2.25 Å resolution. *J Mol Biol* **263**: 20-39.
- Shen, G., Saunee, N.A., Gallo, E., Begovic, Z., Schluchter, W.M., and Bryant, D.A. (2004) Photosynthesis 2004 Light-harvesting Systems Workshop: 14-15.
- Shen, G., Saunee, N.A., Williams, S.R., Gallo, E.F., Schluchter, W.M., and Bryant, D.A. (2006) Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the *cpcT* gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta-subunit of phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J Biol Chem* **281**: 17768-17778.
- Sidler, W., and Zuber, H. (1988) Structural and phylogenetic relationships of phycoerythrins from cyanobacteria, red algae and cryptophyceae. *Photosynthetic Light-Harvesting Systems* **Walter de Gruyter & Co., Berlin**.
- Sidler, W., Nutt, H., Kumpf, B., Frank, G., Suter, F., Brenzel, A., Wehrmeyer, W., and Zuber, H. (1990) The complete amino-acid sequence and the phylogenetic origin of phycocyanin-645 from the cryptophyten alga *Chroomonas* sp. *Biol Chem Hoppe Seyler* **371**: 537-547.
- Sidler, W.A. (1994) The Molecular Biology of Cyanobacteria., *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.
- Soll, J., and Schleiff, E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 198-208.
- Sorby, H.C. (1877) On the characteristic colouring-matters of the red groups of algae. *J Linnean Soc Bot* **15**: 34-40.
- Steglich, C., Frankenberg-Dinkel, N., Penno, S., and Hess, W.R. (2005) A green light-absorbing phycoerythrin is present in the high-light-adapted marine cyanobacterium *Prochlorococcus* sp. MED4. *Environ Microbiol* **7**: 1611-1618.
- Stoebe, B., and Kowallik, K.V. (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet* **15**: 344-347.
- Storf, M., Parbel, A., Meyer, M., Strohmman, B., Scheer, H., Deng, M.G., Zheng, M., Zhou, M., and Zhao, K.H. (2001) Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PecE/PecF, a lyase-isomerase for the photoactive 3(1)-cys-alpha 84-phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin. *Biochemistry* **40**: 12444-12456.
- Swanson, R.V., Zhou, J., Leary, J.A., Williams, T., de Lorimier, R., Bryant, D.A., and Glazer, A.N. (1992) Characterization of phycocyanin produced by *cpcE* and *cpcF* mutants and identification of an intergenic suppressor of the defect in bilin attachment. *J Biol Chem* **267**: 16146-16154.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H.C., Ohno, T., and Tanaka, A. (1999) Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature* **400**: 159-162.
- Toole, C.M., Plank, T.L., Grossman, A.R., and Anderson, L.K. (1998) Bilin deletions and subunit stability in cyanobacterial light-harvesting proteins. *Mol Microbiol* **30**: 475-486.

- Tooley, A.J., Cai, Y.A., and Glazer, A.N. (2001) Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phyocyanin holoprotein in a heterologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10560-10565.
- Ughy, B., and Ajlani, G. (2004) Phycobilisome rod mutants in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Microbiology* **150**: 4147-4156.
- van de Meene, A.M., Hohmann-Marriott, M.F., Vermaas, W.F., and Roberson, R.W. (2006) The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* **184**: 259-270.
- Van de Peer, Y., Rensing, S.A., Maier, U.G., and De Wachter, R. (1996) Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7732-7736.
- van Dooren, G.G., Waller, R.F., Joiner, K.A., Roos, D.S., and McFadden, G.I. (2000) Traffic jams: protein transport in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* **16**: 421-427.
- van Thor, J.J., Gruters, O.W., Matthijs, H.C., and Hellingwerf, K.J. (1999) Localization and function of ferredoxin:NADP(+) reductase bound to the phycobilisomes of *Synechocystis*. *Embo J* **18**: 4128-4136.
- van Thor, J.J., Jeanjean, R., Havaux, M., Sjollem, K.A., Joset, F., Hellingwerf, K.J., and Matthijs, H.C. (2000) Salt shock-inducible photosystem I cyclic electron transfer in *Synechocystis* PCC6803 relies on binding of ferredoxin:NADP(+) reductase to the thylakoid membranes via its CpcD phycobilisome-linker homologous N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* **1457**: 129-144.
- Wastl, J., and Maier, U.G. (2000) Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J Biol Chem* **275**: 23194-23198.
- Waterbury, J.B., and Valois, F.W. (1993) Resistance to Co-Occurring Phages Enables Marine *Synechococcus* Communities To Coexist with Cyanophages Abundant in Seawater. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3393-3399.
- Wedemayer, G.J., Kidd, D.G., and N., G.A. (1996) Cryptomonad biliproteins: Bilin types and locations. *Photosynth Res* **48**: 163-170.
- Whatley, J.M., John, P., and Whatley, F.R. (1979) From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **204**: 165-187.
- Whitten, B.A., and Potts, M. The ecology of cyanobacteria. *Netherlands: Kluwer Academic Publishers*: 149-194.
- Wilbanks, S.M., and Glazer, A.N. (1993) Rod structure of a phycoerythrin II-containing phycobilisome. II. Complete sequence and bilin attachment site of a phycoerythrin gamma subunit. *J Biol Chem* **268**: 1236-1241.
- Wildman, R.B., and Bowen, C.C. (1974) Phycobilisomes in blue-green algae. *J Bacteriol* **117**: 866-881.
- Wilk, K.E., Harrop, S.J., Jankova, L., Edler, D., Keenan, G., Sharples, F., Hiller, R.G., and Curmi, P.M. (1999) Evolution of a light-harvesting protein by addition of new subunits and rearrangement of conserved elements: crystal structure of a cryptophyte phycoerythrin at 1.63-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8901-8906.
- Wu, S.H., and Lagarias, J.C. (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* **39**: 13487-13495.
- Xiong, J., and Bauer, C.E. (2002) Complex evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 503-521.

- Yamanaka, G., Glazer, A.N., and Williams, R.C. (1980) Molecular architecture of a light-harvesting antenna. Comparison of wild type and mutant *Synechococcus* 6301 phycobilisomes. *J Biol Chem* **255**: 11104-11110.
- Zauner, S., Fraunholz, M., Wastl, J., Penny, S., Beaton, M., Cavalier-Smith, T., Maier, U.G., and Douglas, S. (2000) Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 200-205.
- Zhao, K.H., Deng, M.G., Zheng, M., Zhou, M., Parbel, A., Storf, M., Meyer, M., Strohmann, B., and Scheer, H. (2000) Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobilin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon. *FEBS Lett* **469**: 9-13.
- Zhao, K.H., Su, P., Bohm, S., Song, B., Zhou, M., Bubenzer, C., and Scheer, H. (2005) Reconstitution of phycobilisome core-membrane linker, LCM, by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochim Biophys Acta* **1706**: 81-87.
- Zhao, K.H., Su, P., Li, J., Tu, J.M., Zhou, M., Bubenzer, C., and Scheer, H. (2006a) Chromophore attachment to phycobiliprotein beta-subunits: phycocyanobilin:cysteine-beta84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from *Anabaena* Sp. PCC7120. *J Biol Chem* **281**: 8573-8581.
- Zhao, K.H., Wu, D., Zhang, L., Zhou, M., Bohm, S., Bubenzer, C., and Scheer, H. (2006b) Chromophore attachment in phycocyanin. Functional amino acids of phycocyanobilin--alpha-phycocyanin lyase and evidence for chromophore binding. *FEBS J* **273**: 1262-1274.
- Zhou, J., Gasparich, G.E., Stirewalt, V.L., de Lorimier, R., and Bryant, D.A. (1992) The cpcE and cpcF genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Construction and phenotypic characterization of interposon mutants. *J Biol Chem* **267**: 16138-16145.
- Zolla, L., Bianchetti, M., and Rinalducci, S. (2002) Functional studies of the *Synechocystis* phycobilisomes organization by high performance liquid chromatography on line with a mass spectrometer. *Eur J Biochem* **269**: 1534-1542.

Cyanobakterium	Protein	<i>Accession-Number</i>
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Slr1649	NP_441787
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT9313	CpeT	NP_895505
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. NATL2A	CpeT	YP_292867
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. SS120	CpeT	NP_874736
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	CpeT	NP_898094
<i>Gloeobacter violaceus</i>	CpeT	NP_924139
<i>Calothrix</i> sp. (<i>Fremyella diplosiphon</i>)	CpeT	AAK11648
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	CwatDRAFT_5720	ZP_00514725
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS1001	Tery_0979	YP_720833
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	Syc0764_d	YP_171474
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Alr0647	NP_484691
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Ava_4579	YP_325071

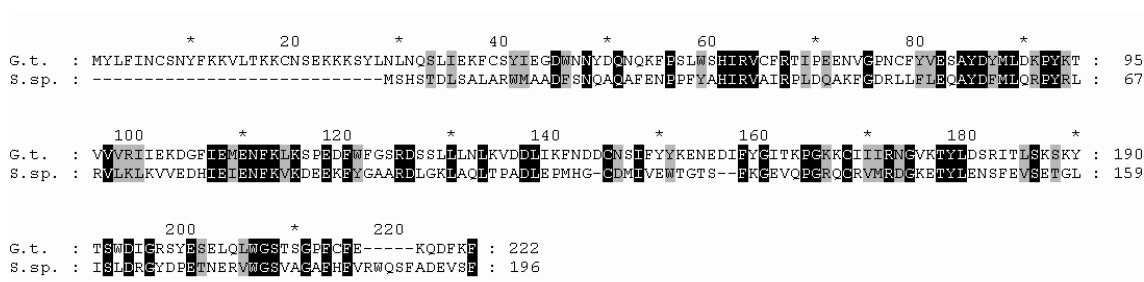


Abb. 7-2: Aminosäure Alignment zwischen dem Slr1649 Protein aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (S.sp.) und dem ORF222 Protein aus *Guillardia theta* (G.t.). Acession Number des Orf222 Proteins: NP_113341.

7.4 Aminosäurealignment der CpcT-Gruppe

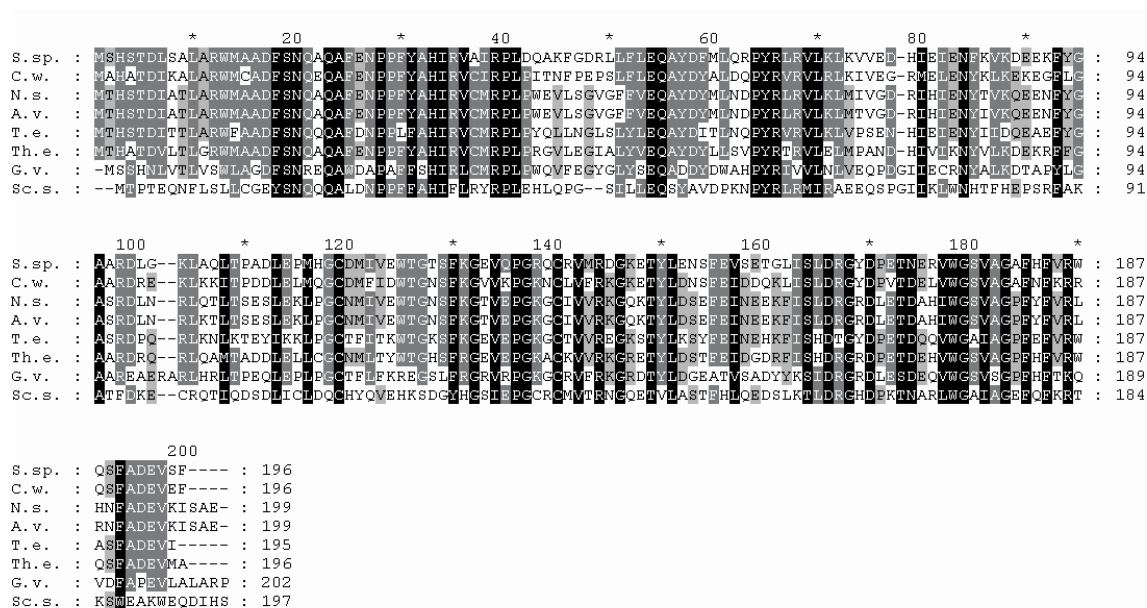


Abb. 7-3: Aminosäure Alignment der Cpc-T Gruppe. S.sp. = *Synechocystis* sp. PCC 6803, Sc.s. = *Synechococcus* sp. WH 8102, G.v. = *Gloeobacter violaceus*, C.w. = *Crocosphaera watsonii* WH 8501, T.e. = *Trichodesmium erythraeum* IMS100, N.s. = *Nostoc* sp. PCC 7120, A.v. = *Anabaena variabilis* ATCC 29413, Th.e. = *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

7.5 Acession Numbers der CpcT-Gruppe

Cyanobakterium	Protein	Acession-Number
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Slr1649	NP_441787
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	SYNW2024	NP_898115
<i>Gloeobacter violaceus</i>	Glr1182	NP_924128
<i>Crocosphaera watsonii</i> WH 8501	CwatDRAFT_4238	ZP_00515713
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS100	Tery_5043	YP_724425
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	All5339	NP_489379
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Ava_2579	YP_323089
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	Tlr2156	NP_682946

7.6 Accession Numbers des Stammbaums

Cyanobakterium	Protein	Accession-Number
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Slr1649	NP_441787
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002		
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	Glr1193 Glr1182 Glr1538	NP_924128 NP_924128 NP_924484
<i>Anabena</i> sp. PCC 7120	All5339 Alr0647	NP_489379 NP_484691
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	Tlr2156	NP_682946
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Synpcc7942_0800 Synpcc7942_0772	YP_399819 YP_399791
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301	Syc0764_d Syc0738_d	YP_171474 YP_171448
<i>Calothrix</i> PCC 7601	CpeT	AAK11648
<i>Prochlorococcus marinus</i> SS120	CpeT	NP_874736
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313	CpeT	NP_895505
<i>Prochlorococcus</i> sp. CC9605	CpeT Syncc9605_0419	YP_380771 YP_380750
<i>Prochlorococcus</i> sp. CC9902	CpeT Syncc9902_1910	YP_377888 YP_377911
<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL2A	CpeT	YP_292867
<i>Synechococcus</i> sp. WH8102	SYNW2024 CpeT	NP_898115 NP_898094
<i>Synechococcus</i> sp. WH8103	ORF198	Q02426
<i>Crocosphaera watsonii</i> WH8501	CwatDRAFT_4238 CwatDRAFT_5720	ZP_00515713 ZP_00514725
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Npun02004130 Npun02007740 Npun02004123	ZP_00109088 ZP_00106171 ZP_00109082
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Ava_2579 Ava_4579	YP_323089 YP_325071
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101	Tery_5043 Tery_0979	YP_724425 YP_720833
<i>Guillardia theta</i>	Orf222	NP_113341
Bakteriophage S-PM2	Orf216	YP_195250

7.7 Plastidenproteine auf Chromosom I des Nukleomorph von *Guillardia theta*

Chromosom I	
Protein	Funktion
SigA (Sigma factor A)	Transkriptioninitiation
GyrA (Gyrase A)	Topoisomerase Untereinheit
ClpP	Proteolytische Untereinheit der Clp Protease
Tic22	Protein Import
ClpP2	Proteolytische Untereinheit der Clp Protease
GyrB (Gyrase B)	Topoisomerase Untereinheit
Hlip (high light induced protein)	Carotin-binding Protein
Met	Methyltransferase
Tha4 (thylakoid assembly 4)	Protein Translokator (Δ pH Weg)
Rps15 (Orf126)	Ribosomales Protein
CpeT (Orf222)	Putative Phycoerythrobilin Lyase
SufD (Orf467)	Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese
orf176	Unbekannte Funktion
orf228	
orf773	

Tab. 7-1: Auflistung der Proteine mit cyanobakteriellen Homologen die auf dem Nukleomorph Chromosom I codiert sind. Fett gedruckt sind Proteine die auch auf dem Nukleomorph Genom von *B. natans* vorkommen.

7.8 Plastidenproteine auf Chromosom II des Nukleomorph von *Guillardia theta*

Chromosom II	
Protein	Funktion
FtsZ	Plastiden Teilung
Rub (Rubredoxin)	Elektronentransport
SecE (Secretory protein E)	Protein Translokase
Iap100 (import intermediate associated protein)	Protein Import
Hcf136 (high chlorophyll fluorescence)	Photosystem II Assemblierung
CbbX (Calvin-Bensson-Basham protein X)	CO ₂ -Fixierung
DnaG	DNA-Primase
Cpn60 (GroEL)	Chaperon
GidA (Glucose inhibited division protein A)	Translation
Tab2 (Orf323)	Initiation der Translation von psaB
Orf496	Unbekannte Funktion
Orf163	
Orf249	
Orf227	
Ycf20 (Orf125)	

Tab. 7-2: Auflistung der Proteine mit cyanobakteriellen Homologen, die auf dem Nukleomorph Chromosom II codiert sind. Fett gedruckt sind Proteine die auch auf dem Nukleomorph Genom von *B. natans* vorkommen.

Danke

Bedanken möchte ich mich bei Professor Dr. Uwe G. Maier für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des interessanten Themen-Komplexes.

Danken möchte ich Dr. Stefan Zauner für viele interessante Diskussionen und Anregungen (auch zu späterer Stunde), sowie die Bereitschaft diese Arbeit zu korrigieren.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Nina, für ihre Geduld und ständige Unterstützung, insbesondere in den Wochen des Schreibens. **Danke!!**

Selbstverständlich ein Riesen-Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe Maier, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

Danke auch an meine Familie für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

Ein Dank geht an Reinhard Reichert für die Korrektur dieser Arbeit.

Danke auch an Julius Nyalwidhe für die MALDI-TOF Analysen und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich Dr. Uwe Linne für die ESI-MS Analysen danken.

Großes Dankeschön an Pension Hempel und Pension Bolte/Weidler für die Unterbringung.

Abschließend möchte ich noch allen Ex- und Noch-Marburgern für die schöne Zeit, auch Abseits von Uni und Labor danken.

Curriculum vitae

Promotion

09/2003 - 12/2006
Philipps Universität Marburg
Promotion in der Arbeitsgruppe Prof. Maier (Zellbiologie)
Voraussichtlicher Titel der Promotion: „Charakterisierung des Slr1649 von *Synechocystis* sp. PCC 6803, ein Homolog zu Orf222 aus *Guillardia theta*“

Hochschulausbildung

11/2002-07/2003
Philipps Universität Marburg
Diplomarbeit im Fach Zellbiologie
Titel der Diplomarbeit: „Etablierung eines Hefe Zwei-Hybrid Systems und Charakterisierung des Orf160 von *Guillardia theta*“.

09/1998-10/2002
Philipps Universität Marburg
Studium der Biologie mit den Hauptfächern:
Zellbiologie, Entwicklungsbiologie und Virologie

03/1998-08/1998
Fachhochschule Gießen-Friedberg
Studium der Biomedizintechnik

Berufsausbildung

04/1996-03/1997
Lehranstalt für Rettungsdienst des DRK in Mainz
Ausbildung zum staatlich geprüften Rettungsassistenten

Schulbildung

06/1994
Staatliches Leibniz-Gymnasium Neustadt an der Weinstraße
Allgemeine Hochschulreife
Prüfungsfächer: Biologie, Deutsch, Sozialkunde und Englisch

1984-1994
Staatliches Leibniz-Gymnasium Neustadt an der Weinstraße

1980-1984
Grundschule Neidenfels

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „**Charakterisierung des Slr1649 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, ein Homolog zu Orf222 aus *Guillardia theta***“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg an der Lahn den 12.11.2006